Darstellung, Metallbindungsvermögen und biologisches Verhalten von Zucker-Aminosäure-Verbindungen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
RUDOLF DRZENIEK
aus Radlin/Oberschlesien

7133

1962

Darstellung, Metallbindungsvermögen und biologisches Verhalten von Zucker-Aminosäure-Verbindungen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
RUDOLF DRZENIEK
aus Radlin/Oberschlesien

1962

7540/62

Tag der mündlichen Prüfung: 14. 12. 1961

Dekan: Professor Dr. Werner B r a u n b e k

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. Günther W e i t z e l

2. Berichterstatter: Professor Dr. Heinrich H e l l m a n n

F o t o d r u c k P R Ä Z I S · Tübingen

Die vorliegende Arbeit wurde während der Jahre 1959-1961 im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Dr. Günther W e i t z e l

Direktor des Physiologisch-Chemischen Instituts

danke ich herzlich für seine wohlwollende Unterstützung und für die Überlassung des Themas.

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir mit Rat und Tat bei der Ausführung der vorliegenden Arbeit behilflich waren, vor allem: Herrn Doz. Dr. E.Buddecke, Frl. Wiss.Rat Dr. A.M.Fretzdorff, Herrn Dr. H.Pfeil, Herrn Dr. W.Schaeg, Herrn Dr. F.Schneider sowie Herrn Huber, Frl. S.Wulf, Frl.I.Dahlström, Frl. A.David und Frl. Busch.

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung 6

II. Problemstellung 7

III. Allgemeine Literaturübersicht 8

1. Die Amadori-Verbindungen 8
2. Die Heyns-Verbindungen 10
3. Glucosaminsäure 10
4. Mucopolysaccharide und deren Bausteine . 11

Eigene Versuche

IV. Darstellung reiner Liganden

1. Fructose-Glycin 12
2. Fructose-Asparaginsäure 13
3. Glucose-Glycin 14
4. Glucosaminsäure 14

V. Tierversuche 14

VI. Warburg-Versuche 17

VII. Schwermetallkomplexe

A. Titration der freien Liganden 18

B. Titration und Spektrophotometrie der metallhaltigen Lösungen 21

1. Kupferkomplexe

a) Fructose-Glycin 21
b) Fructose-Asparaginsäure 26
c) Glucose-Glycin 29
d) Glucosaminsäure 33

2. Zinkkomplexe 36

a) Fructose-Glycin 36
b) Fructose-Asparaginsäure 39

Seite

c) Glucose-Glycin 40
d) Glucosaminsäure 41

3. Nickelkomplexe 41

a) Fructose-Glycin 41
b) Fructose-Asparaginsäure 45
c) Glucose-Glycin 48
d) Glucosaminsäure 49

C. Stabilitätskonstanten 51

D. Diskussion der Stabilitätskonstanten 55

VIII. Calciumkomplexe 59

IX. Zur Struktur von Amadori-Verbindungen und ihrer Schwermetallkomplexe 65

X. Über das Vorkommen von Amadori-Verbindungen in der Leber 69

XI. Beschreibung der Versuche und Berechnungen

1. Die Darstellung reiner Liganden

a) D-Fructose-Glycin 74
b) D-Fructose-Asparaginsäure 76
c) D-Glucose-Glycin 77
d) D-Glucosaminsäure 78

2. Tierversuche 79
3. Warburg-Versuche 80
4. Ausführung der Titrationen 80
5. Ermittlung der Basizitätskonstanten . . . 81
6. Die spektrophotometrische Untersuchung . . 83
7. Titration der Liganden in Gegenwart von Metallionen 83
8. Berechnung der Stabilitätskonstanten der Metallchelate 84
9. Ausführung der Versuche zur Bestimmung des Calciumbindungsvermögens 87
10. Für die Bestimmung des Calciumbindungsvermögens benutzte Substanzen

a) Reagenzien 90
b) Ligandlösungen 90

Seite

11. Berechnung der Stabilitätskonstanten der Calciumchelate 91
12. Zusammenhang zwischen „Physiologischer Bindungskonstante" und „Over-all" Stabilitätskonstante 92
13. Stickstoffanalysen 94
14. Metallanalysen 94
15. Papierchromatographie 94

Zusammenfassung 95

Anhang 98

Literaturverzeichnis 100

I. Einleitung

Metallkomplexe organischer Liganden beanspruchen das Interesse fast aller Gebiete der Chemie.

In der organischen Chemie benutzt man oft Metallionen zur Aktivierung, Hemmung oder Selektivierung einer Reaktion. Auch die theoretische organische Chemie zieht Metallchelate für ihre Untersuchungen heran, wodurch ein tieferer Einblick in die Reaktionsmechanismen möglich wird[1]. In jüngster Zeit wurden Metallchelate beschrieben, die in einem heterozyklischen Ring ein Metallatom enthalten und dadurch wie aromatische Systeme reagieren[2].

In der Biochemie findet man viele metallabhängige Reaktionen, da fast alle Fermentreaktionen durch Metallionen beeinflusst werden. Deshalb lenkt die heutige Biochemie ihre Aufmerksamkeit immer mehr auf die Wechselwirkungen zwischen Metallionen (die in jedem Organismus, auch dem primitivsten, gefunden werden) und Zellbestandteilen. Erst das Verständnis dieser Wechselwirkungen ermöglicht eine exakte Beschreibung des Einflusses von Metallionen auf den Stoffwechsel.

Auch die medizinische Forschung wendet Metallchelate an[3]: so werden Metallionen, die im lebenden Organismus vorkommen und für seine Funktion wichtig sind, durch geeignete Liganden blokkiert, z.B. wird die Gerinnung des Blutes durch das Abfangen von Calciumionen gehemmt. Chelatbildner machen Metallionen „körperfähig", d.h. gestatten das Eindringen von Metallionen in die Organe (Eisentherapie bei verschiedenen Anämieformen durch Verabreichung von Eisen(II)diglycinat). Chelatbildner verteilen essentielle Spurenelemente im Körper (Behandlung der Wilsonschen Krankheit) oder entfernen unerwünschte Metallionen aus dem Körper, z.B. bei Schwermetallvergiftungen oder radioaktiver Verseuchung. Die Anzahl von Chelatbildnern, die für therapeutische Zwecke in Frage kommen, ist indessen relativ klein, weil die Liganden entsprechende Eigenschaften besitzen müssen. So ist z.B. das ÄDTA ein guter Chelatbildner für fast alle Metallionen,

jedoch nicht in der Lage die Zellmembran von Säugetierzellen zu passieren[3]. Von diesen Erwägungen ausgehend wird nach Chelatbildnern gesucht, die relativ stabile Metallchelate bilden und fähig sind die Zellmembran zu passieren.

Eine interessante Möglichkeit in dieser Richtung bieten die Amadori-Verbindungen von Kohlehydraten und Aminosäuren. Diese „Fructose-Aminosäuren" stimulieren den Einbau von Aminosäuren in Retikulozyten besonders in Gegenwart von Eisenionen[4]. Aller Wahrscheinlichkeit nach handelt es sich hier um einen Eisentransport in die Retikulozyten, der durch die Amadori-Verbindungen erleichtert wird. Derartige „Fructose-Aminosäuren" (Amadori-Verbindungen) wurden in verschiedenen Organismen nachgewiesen (s.u. S.14ff), ausserdem kommen sie in vielen Nahrungsmitteln vo

Ausser „Fructose-Aminosäuren" sind ähnliche Zucker-Aminosäureverbindungen bekannt, z.B. die „Glucose-Aminosäuren" und die Glucosaminsäure. In diese Substanzgruppe gehören auch die in der Natur weit verbreiteten Mucopolysaccharide sowie deren Bausteine, die auch stickstoffhaltige Kohlehydrate sind.

II. Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit werden Metallchelate stickstoffhaltiger Kohlehydrate untersucht. Vor allem sollte geklärt werde

1. Ob Fructose-Aminosäuren (Amadori-Verbindungen) in der Lage sind, stabile Metallchelate mit Calcium- und Schwermetallionen zu bilden.
2. Ob Glucose-Aminosäuren (Heyns-Verbindungen) mit den gleichen Metallionen stabile Metallchelate bilden.
3. Wie sich Glucosaminsäure als Chelatbildner verhält.
4. Ob Mucopolysaccharide und deren Bausteine als Liganden für Calciumionen in Frage kommen.
5. Ob Fructose-Aminosäuren vom Säugetierkörper umgesetzt werden können.

Um diese Fragen zu beantworten, mussten zunächst die benötigten Substanzen im reinen Zustand dargestellt werden.

III. Allgemeine Literaturübersicht

Die Chemie und Biochemie der Aminozucker erfreut sich eines grossen Interesses, seitdem man festgestellt hat, dass diese Verbindungen teils als Bausteine von polymeren Substanzen, wie der Mucopolysaccharide und Mucoproteide, teils als niedermolekulare Substanzen im lebenden Organismus eine wichtige Rolle spielen. Dieses Interesse spiegelt sich in der sprunghaft anwachsenden Literatur wider, die in mehreren Übersichten dargestellt ist[5)6)7)].

Trotz dieser Fülle von Veröffentlichungen über Aminozucker gibt es fast gar keine Untersuchungen über die Wechselwirkung von Metallionen mit Aminozuckern, obwohl diese wegen ihres hohen Gehaltes an „Heteroatomen" wie Sauerstoff und Stickstoff für die Komplexbildung als sehr geeignet erscheinen.

In der vorliegenden Arbeit werden als Liganden einfache Vertreter typischer - und für die Komplexbildung mit Metallionen aussichtsreicher - Verbindungsklassen eingesetzt. Es handelt sich um folgende Verbindungen:

1. 1-Carboxymethylamino-1-desoxy-D-fructose (Fructose-Glycin, abgekürzt als „Fru-Gly") und 1-N-Asparaginsäure-1-desoxy-D-fructose (Fructose-Asparaginsäure, abgekürzt „Fru-Asp") als Vertreter der Amadori-Verbindungen.
2. 2-Carboxymethylamino-2-desoxy-D-glucose (Glucose-Glycin, angekürzt als „Gluc-Gly") als Vertreter der Heyns-Verbindungen.
3. D-Glucosaminsäure als Vertreter vom oligohydroxylhaltigen Aminosäureverbindungen.
4. Mucopolysaccharide und deren Bausteine.

1. Die Amadori-Verbindungen

Unter Amadori-Verbindungen versteht man N-alkylierte- und N-arylierte 1-Amino-1-desoxyketosen. Diese Verbindungsklasse wurde von Mario Amadori bei der Kondensation von Glucose mit aromatischen Aminen entdeckt (zusammenfassende Übersichten:[5)8)]), der sie irrtümlicherweise als Schiffsche Basen der Glucose an-

sprach. Erst Kuhn und Weygand[9] erkannten, dass bei der Reaktion von Glucose mit aromatischen Aminen eine Umlagerung der primär gebildeten N-Glucoside in N-substituierte 1-Amino-1-desoxyfructose stattfindet. Diese Umlagerung nannten sie Amadori-Umlagerung. Heute ist es üblich, die bei dieser Umlagerung entstehenden Produkte, als Amadori-Verbindungen zu bezeichnen.

Durch die Arbeiten von Gottschalk[10], der in Mucoproteiden Fructose-Aminosäuren nachwies, als Modellsubstanz das Fructose-Phenylalanin darstellte[11] und an dieser Verbindung die Eigenschaften von Fructose-Aminosäuren untersuchte, wurde die Aufmerksamkeit auf Amadori-Verbindungen von Zuckern und Aminosäuren, gelenkt.

Später isolierten Borsook und Mitarbeiter[4] aus getrockneter Leber Fructose-Aminosäuren. Im Anschluss daran stellten Abrams, Lowy und Borsook[12] chromatographisch reine Fructose-Aminosäuren aus neutralen, sauren und aromatischen Aminosäuren dar, später auch aus basischen Aminosäuren[13]. Die von Gottschalk und Borsook beschriebenen Verbindungen waren nicht kristallin.

Kristalline Verbindungen erhielten Anet[14] und Duborg und Devillers[15]. Während der Ausführung der vorliegenden Arbeit veröffentlichten Heyns und Paulsen[17] eine Abhandlung über Fructose-Aminosäuren und Glucose-Aminosäuren in Leberextrakten, in der sie die Darstellung kristallisierter Verbindungen beschreiben und gleichzeitig feststellen, dass in der frisch aufgearbeiteten Leber keine Fructose-Aminosäuren gefunden werden. In einer späteren Arbeit gelang es Heyns und Schulz[18] Fructuron-Aminosäuren darzustellen.

In jüngster Zeit[19] wurden Fructose-Peptide und zwar Fru-Gly-Gly, Fru-Gly-Gly-Gly und Fru-Gly-Leu synthetisiert. In einer japanischen Arbeit[20] wird Tagatose-Glycin beschrieben. Richards[21] kristallisierte Fructose-Glycin als Natriumsalz.

Die Amadori-Verbindungen beanspruchen seit geraumer Zeit ein wachsendes Interesse als Zwischenprodukte bei der Maillard-Reaktion (eine gute Übersicht über diese Reaktion und die Rolle der Amadori-Verbindungen gibt Ellis[22]). Hervorzuheben seien hier die Arbeiten von Richards[21] und vor allem die neueren Arbeiten von Anet[14)23)24)25)26)27)28)29)], welcher Difructose-Aminosäuren als Zwischenprodukte der Maillard-Reaktion vermutet.

2. Die Heyns-Verbindungen

Setzt man Ketosen in geeigneter Weise mit Aminen um, dann erfolgt eine Umlagerung des primär gebildeten Ketosyl-amins in eine 2-Alkylamino-2-desoxyaldose. Diese Umlagerung wurde von Heyns[30)31)] und Carson[32)] beobachtet und von Baer[5)] „Heyns-Carson-Umlagerung" genannt. Die bei dieser Umlagerung entstehenden Produkte werden gewöhnlich „Heyns-Verbindungen" genannt. Die uns hier interessierenden Verbindungen, welche aus Fructose und Aminosäuren entstehen, werden als Glucose-Aminosäuren bezeichnet. Sie wurden erstmals von Heyns und Mitarbeitern dargestellt[33-36)]. Es gelang auch Peptide[37)] und Gelatine[38)] mit Fructose in die entsprechenden Glucosaminderivate überzuführen.

Auf einem andern Weg (durch katalytische Halbhydrierung der entsprechenden Nitrile) erhielten Kuhn und Biester[39)] Glucose-Glycin.

Über das Vorkommen dieser Glucose-Aminosäuren in der Natur ist noch sehr wenig bekannt. Heyns und Paulsen[17)] stellten lediglich fest, dass in der frisch aufgearbeiteten Leber keine Glucose-Aminosäuren gefunden wurden. Es wird jedoch die Biosynthese von Glucosaminderivaten aus Fructose und Amin diskutiert. Leloir und Cardini[40)] nehmen eine Heyns-Umlagerung von Fructose-6-phosphat und Glutamin in Glucosamin-6-phosphat an. Neuerdings konnten Ghosh et al. zeigen[41)], dass in Bakterien (Escherichia coli), Schimmelpilzem (Neurospora crassa) und Rattenleber ein Enzym vorhanden ist, welches Fructose-6-phosphat und L-Glutamin in Glucosamin-6-phosphat und L-Glutaminsäure in einer irreversiblen Reaktion, überführt.

Über Metallkomplexe von Heyns-Verbindungen finden sich keine Angaben in der Literatur.

3. Glucosaminsäure

Metallkomplexe der Glucosaminsäure wurden von Karrer und Mayer[42)] und Schaeg[43)] (der die Stabilitätskonstante für die Glucosaminsäure-Zinkkomplexe angibt) untersucht.

Mit der Darstellung der Glucosaminsäure haben sich verschiedene Autoren befasst. Hier seien nur die Arbeiten von Pringsheim und Ruschman[44)], Levene[45)46)], Ebata[47)] und Heyns[48)] erwähnt.

Neuerdings interessiert man sich für den Stoffwechsel der

Glucosaminsäure[49]. Gewisse Bakterien sind in der Lage Glucosamin zu Glucosaminsäure zu oxydieren[50], welche über 2-Keto-3-desoxygluconsäure zu Pyruvat und Phosphorglyceraldehyd abgebaut wird[51)52]. Auch Säugetiere können Glucosaminsäure metabolisieren[53].

4. Mucopolysaccharide und deren Bausteine

Obwohl Mucopolysaccharide und deren Bausteine seit langem bekannt sind - das Glucosamin wurde im Jahre 1876 durch Ledderhose entdeckt - und obwohl sie heute intensiv untersucht werden (Übersichten [5-7)49)54-57]), weiss man fast gar nichts über das Metallbindungsvermögen dieser Substanzen. Es wurde lediglich festgestellt, dass z.B. im arteriosklerotischen Gewebe des Menschen Calcium- und Chrondroitinsulfaterhöhung parallel verlaufen[58], dass im Serum nach Heparingaben eine Pseudohypokalcämie auftritt[59], dass Knorpelgewebe Calcium stärker bindet als Alkalimetalle[60]. Mit Ausnahme der Arbeiten von Gilbert und Myers[61], die unter unphysiologischen Verhältnissen ausgeführt wurde, und von Mathews[62], der Cobalthexamminkomplexe untersuchte, wurden keine Stabilitätskonstanten für Mucopolysaccharid-Metallchelate angegeben. Von den Bausteinen der Mucopolysaccharide sind nur die Stabilitätskonstanten für Gluconsäurechelate bekannt[63].

E I G E N E . V E R S U C H E

IV. Darstellung reiner Liganden

1. Fructose-Glycin

Am Anfang des Jahres 1959 waren die Methoden von Borsook und Mitarbeitern[12)13)] für die Darstellung von Fructose-Aminosäuren allgemein bekannt. Die auf diese Weise erhaltenen Verbindungen waren amorph. Im hiesigen Institut sind Versuche von Geyer[16)] zur Darstellung reiner Fructose-Aminosäuren unternommen worden, die amorphe, labile und nicht chromatographisch reine Verbindungen ergaben.

Deshalb wurde zunächst versucht Fructose-Aminosäuren in kristallinem Zustand darzustellen. Dabei wurde nach der Borsookschen Methode gearbeitet. Aus einem Ansatz von Glucose und Glycin in absolutem Methanol und anschliessende Chromatographie an Dowex 50 (H^+-Form) wurde aus Methanol/Wasser ein kristalliner Niederschlag von Fructose-Glycin erhalten. Es war jedoch schwierig dieses Ergebnis zu wiederholen.

In dieser Zeit erschien eine Arbeit von Heyns und Paulsen[17)], welche kristalline Amadori-Verbindungen dargestellt hatten. Die genannten Autoren erhitzten Glycin mit einem zehnfachen Überschuss an Glucose 2,5 Stunden in wasserfreiem Methanol und chromatographierten das entstandene Gemisch an einer Lewatit S-100 Säule (H^+-Form), wobei sie zuerst mit Wasser und dann mit 0,2 n Trichloressigsäure eluierten, die TCE durch Ausäthern entfernten und aus Butanol/Methanol/Wasser kristallisierten. Mit dieser Methode erhielt ich zwei Chargen von kristallinem, chromatographisch reinem Fructose-Glycin, die für die Untersuchung des Metallbindungsvermögens eingesetzt wurden. Dabei wurde festgestellt, dass die Operation des Ausätherns der Trichloressigsäure sehr gründlich vorgenommen werden muss: es ist zweckmässig solange zu extrahieren bis das pH der Lösung höher als 3,5 ist. Da dies mit der Ausschüttelungstechnik und mit dem Kutscher-Steudel-Perforator sehr zeitraubend ist, wurde ein neuer Perforator konstruiert, der sich bestens bewährte.

Die damit erhaltenen Präparate zeigten zufriedenstellende Stickstoffanalysen und kristallisierten nach zweifachem Umkristallisieren binnen weniger Minuten als weisse, gut sichtbare Kristalle.

Die angegebene Methode hat jedoch zwei Nachteile: 1. werden grosse Mengen an absolutem Methanol für die Reaktion gebraucht und 2. ist die Entfernung der Trichloressigsäure recht umständlich.

In dieser Phase erschien die Arbeit von Reynolds[64], der die Reaktion zwischen Glucose und Glycin in einer hochkonzentrierten wässrigen Lösung bei 100° binnen einer Stunde und unter Zusatz von Natriummetabisulfit ausführte. Leider war die darauf folgende chromatographische Trennung sehr umständlich, da sie über vier Dowex 50 X-4 Säulen (nach Anet[14]) geführt wurde, mit Äthanol/Wasser und 0,1 n Ammoniak als Elutionsmittel.

Ein entsprechender Versuch, die Reynoldssche Methode zu vereinfachen, verlief positiv: die Reaktion wird nach der Vorschrift von Reynolds ausgeführt, die chromatographische Trennung jedoch mit einer Lewatit S 100 Säule (H^+-Form), die nach dem Auftragen des Reaktionsansatzes zuerst mit Wasser und dann mit 0,1 n Ammoniak eluiert wird. Dabei entfällt auch das umständliche Entfernen der Trichloressigsäure, da der Ammoniak im Rotationsverdampfer entfernt werden kann. Es gelang auf diese Weise schon nach der ersten Kristallisation fast weisses, schön kristallisiertes Fructose-Glycin in Dekagramm-Mengen zu erhalten. Damit konnten Tierversuche und die spektrophotometrischen Messungen ausgeführt werden, bei denen grössere Substanzmengen gebraucht werden.

2. Fructose-Asparaginsäure

Die Reaktion zwischen Asparaginsäure und Glucose wurde in absolutem Methanol ausgeführt. Die Asparaginsäure wurde vorher mit Kaliumhydroxyd halbneutralisiert und getrocknet. Das Reaktionsgemisch wurde auf eine Lewatit S 100 Säule (H^+-Form) aufgetragen und mit 0,1 n Ammoniak eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden papierchromatographisch geprüft und auf Fructose-Asparaginsäure aufgearbeitet. Die Kristallisation erfolgte aus Wasser/Isopropanol[17]. Die erhaltenen Fructose-Asparaginsäurefraktionen waren weiss, kristallin, papierchromatographisch rein.

3. Glucose-Glycin

Die Darstellung erfolgte nach Heyns und Breuer[33)36)]. Dabei wurde eine Vereinfachung eingeführt: anstatt die einzelnen Fraktionen papierchromatographisch zu prüfen, gelingt es durch Messung der optischen Aktivität eine Fraktion herauszuschneiden, die kristallines, chromatographisch reines Glucose-Glycin liefert.

4. Glucosaminsäure

Die Darstellung erfolgte nach Pringsheim und Ruschman[44)] durch Oxydation von Glucosaminhydrochlorid mit Quecksilber(II)-oxyd.

Die übrigen Substanzen waren Handelspräparate oder stammten von Dr. E.Buddecke. Sie wurden für die Bestimmung der Calciumaffinität als Kaliumsalze eingesetzt oder mit Kalilauge neutralisiert, wobei das pH = 7,2 eingestellt wurde.

V. Tierversuche

Als Borsook et al.[4)] Fructose-Aminosäuren in Säugetierleber nachgewiesen und dabei festgestellt hatten, dass diese Verbindungen die Inkorporation von Aminosäuren in Retikulozyten stimulieren, wurden derartige Substanzen allgemein interessant. Es stellte sich jedoch später heraus[17)], dass Fructose-Aminosäuren dieser Art in der Leber erst post mortem entstehen. Wie unten gezeigt wird, sind Amadori-Verbindungen in der Leber aber doch vorhanden (s. Kap. X).

Im Tryptophanstoffwechsel von Bakterien und Pilzen nimmt man Amadori-Produkte als Zwischenstufen der Biosynthese an[65-71)]. Aller Wahrscheinlichkeit nach sind hier die Verbindungen (bisher wurden Fructose- und Ribulose-Anthranilsäure nachgewiesen) in der Zelle entstanden und dann nach aussen ins Medium diffundiert. Es ist aber nicht sicher, ob diese Produkte auch von aussen i n die Zelle gelangen können.

Weygand postuliert Amadori-Verbindungen bei der Leukopterin-Biosynthese[72)] als Zwischenprodukte.

Fructose-Aminosäuren kommen in sehr vielen Nahrungsmitteln vor, weil sie leicht aus Aldosen und Aminosäuren, Peptiden und Proteinen gebildet werden. Wie schon erwähnt wiesen Borsook et al[4] Amadori-Verbindungen in getrockneter Leber nach. Anet und Reynolds[23] fanden in gelagertem Pfirsich- und Aprikosenpüree elf verschiedene Fructose-Aminosäuren. Ingles und Reynolds[73] konnten in gefriergetrockneten und ein Jahr gelagerten Aprikosen nachweisen, dass 90 % der verschwundenen Aminosäuren in Form von Fructose-Aminosäuren wiedergefunden werden. Nordin und Johnson[74] stellten die Anwesenheit von Amadori-Verbindungen in Backwaren fest. In diesen Fällen hatten Aminosäuren und Aldosen (oder die entsprechenden polymeren Substanzen) miteinander zu Amadori-Verbindungen reagiert und zwar meistens bei geringem Wassergehalt (oft in „festem" Zustand) und bei Zimmertemperatur. Unter diesen Bedingungen ist also die Anwesenheit von Amadori-Verbindungen in allen Nahrungsmitteln zu erwarten, die Aminosäuren (oder Polypeptide) und Aldosen (oder Polysaccharide) enthalten. Deshalb darf man annehmen, dass diese Verbindungsklasse weiter verbreitet ist, als man heute glaubt.

Vor allem werden noch unter den Bräunungsprodukten, die während der Maillard-Reaktion entstehen, Amadori-Verbindungen zu finden sein. Die gebildeten Bräunungsprodukte werden von Trypsin und Pepsin schlechter verdaut als das eingesetzte Eiweiss[75].

Aber nicht nur bei niedrigem Wassergehalt reagieren Aldosen und Aminosäuren miteinander zu Amadori-Verbindungen, sondern wie Nordin und Kim[76] gezeigt haben, auch in verdünnten wässrigen Lösungen, was etwas verwunderlich erscheint, da in diesem Fall die N-Glycosidbildung stark benachteiligt ist.

Im Zusammenhang mit der weiten Verbreitung von Amadori-Verbindungen interessiert die Frage, ob sie im Säugetierkörper von den Geweben aufgenommen und verwertet werden können.

Um das zu entscheiden, führte ich folgende Tierversuche aus:

A. Weisse Mäuse bekamen intraperitoneal 3 x 100 mg Fructose-Glycin (in Abständen von je 4 Stunden), welches sie ohne sichtbare Beschwerden vertrugen. Auf die gleiche Weise wurden einer anderen Maus 120 mg Glycin injiziert: nach

20 Minuten war die Maus tot. Bei einer Injektion von 60 und 30 mg Glycin wurden Veränderungen im Verhalten der Mäuse beobachtet (Benommenheit, Durst, sie reagierten nicht auf die Umwelt).

B. Weisse, nüchterne Mäuse bekamen i.p. 100 mg Fru-Gly. Im 24-Stundenharn konnte Fru-Gly nachgewiesen werden (papierchromatographisch).

C. Weisse, nüchterne Mäuse bekamen zwischen 15 und 160 mg Fru-Gly. Im Harn wurden mit einer besonderen Reduktionsprobe, die der Bestimmung von Fru-Gly angepasst ist, die Reduktionswerte bestimmt. Parallel dazu wurde Glycin injiziert und mit dem gleichen Test die Menge an reduzierenden Substanzen bestimmt. Auf diese Weise wurden 80 % des injizierten Fru-Gly als „reduzierende Substanz" wiedergefunden. Eine papierchromatographische Prüfung ergab, dass der grösste Teil der „reduzierenden Substanz" als Fru-Gly vorhanden war. Ausserdem wurden noch Harnsäure und zwei nicht identifizierte TTC-positive Substanzen gefunden.

D. Weissen, nüchternen Mäusen wurden immer kleiner werdende Mengen (von 30 mg bis 0,1 mg pro Maus) an Fructose-Glycin injiziert. Im 24-Stundenharn konnte noch Fru-Gly papierchromatographisch nachgewiesen werden, wenn die injizierte Menge grösser als 0,2 mg pro Maus war.

E. Weisse, nüchterne Ratten (ca. 200 g) bekamen per os 50 mg Fru-Gly in 2 ml Wasser gelöst. Nach zwei Stunden wurde die Harnblase punktiert und deren Inhalt papierchromatographisch untersucht. Dabei wurde einwandfrei Fructose-Glycin nachgewiesen.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass

1. Fructose-Glycin nicht toxisch ist (bei 100 mg i.p. Injektion pro 25 g Maus),
2. intraperitoneal verabreichtes Fru-Gly im Harn nachgewiesen werden kann,
3. Fructose-Glycin langsam oder gar nicht vom Säugetierkörper metabolisiert wird,
4. per os verabreichtes Fru-Gly schon nach zwei Stunden im Harn erscheint.

VI. Warburg-Versuche

An Mäuseasciteszellen wurde untersucht, ob sie Fructose-Glycin verwerten können. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 1 zusammengestellt:

Tabelle 1

Untersuchung der anaeroben Gärung und Atmung von Mäuse-Asciteszellen in Gegenwart von Fructose-Glycin und anderen Kohlehydraten[x)]

Untersucht wurde die	Substrat	Q_{CO_2} bzw. Q_{O_2} $\frac{mm^3}{Std. \times 10^6 Zellen}$	Q_{CO_2} bzw. Q %
Anaerobe Gärung	Glucose	16,13 ± 0,20	100 ± 1,3
"	Fructose + Glycin	15,49 ± 0,08	96 ± 0,6
"	Fructose-Glycin	0,23 ± 0,02	1
"	Fru-Gly + Fructose	14,66 ± 0,06	91 ± 0,5
"	Fru-Gly + Glucose	14,72 ± 0,11	91 ± 0,9
"	Wasser	0,31 ± 0,01	2
"	Glycin[xx)]	0,21 ± 0,02	2
Atmung	Puffer	2,40 ± 0,01	100 ± 0,4
"	Glucose	1,63 ± 0,11	68 ± 6,2
"	Fructose-Glycin	2,27 ± 0,16	95 ± 7,5
"	Fructose	1,54 ± 0,01	64 ± 0,3
"	Fru-Gly + Glycin	1,61 ± 0,05	67 ± 3,0
"	2-Desoxyglucose	2,07 ± 0,16	86 ± 7,7

x) Näheres s.u. Kap. XI.

xx) Werte aus einem anderen Ansatz.

Daraus lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. Fructose-Glycin wird nicht glykolisiert, es erleidet auch keine Decarboxylierung,
2. es hemmt sehr schwach die anaerobe Gärung von Glucose,
3. es setzt sehr wenig oder gar nicht die endogene Atmung von Asciteszellen herab, d.h. es ruft keinen Crabtree-Effekt[77] hervor. Die als Kontrollsubstanzen eingesetzten Verbindungen Glucose, Fructose und 2-Desoxyglucose geben einen deutlichen Crabtree-Effekt.

Die gefundenen Ergebnisse an Asciteszellen stimmen mit den Tierversuchen überein. Sie weisen darauf hin, dass Fructose-Glycin sehr langsam oder gar nicht in Säugetierzellen metabolisiert wird. Aller Wahrscheinlichkeit nach wird das Fructose-Glycin durch die Hexokinase nicht phosphoryliert, wie entsprechende Versuche von Frl. A.Fischer im hiesigen Institut zeigen (A.Fischer, Dissertation Tübingen, 1961).

Die Befunde weisen darauf hin, dass in Nahrungsmitteln aus Kohlehydraten und Proteinen gebildete Amadori-Verbindungen vom tierischen Organismus nicht verwertet werden können.

VII. Schwermetallkomplexe

A. Titration der freien Liganden

Für die Berechnung von Stabilitätskonstanten der Metallchelate ist die Kenntnis der Dissoziationskonstanten der freien Liganden notwendig. Wegen der Analogie der untersuchten Zucker-Aminosäureverbindungen mit Aminosäuren wurden die Dissoziationskonstanten der neuen Liganden analog zu diesen bestimmt: die Messung erfolgte in einer 0,1 m Kaliumchloridlösung, wobei der Ligand in 10^{-2} m Konzentration mit einem Äquivalent Salzsäure eingesetzt und die Titration mit 1 n Kalilauge durchgeführt wurde.

Aus diesen potentiometrischen Titrationen (Abb.1) wurden die log-Werte der Basizitätskonstanten berechnet, die folgendermassen definiert sind.

Für die Reaktion:

$$RH \rightleftharpoons R^- + H^+$$

die Dissoziationskonstante:

$$K = \frac{[H^+]\cdot[R^-]}{[RH]}$$

die Basizitätskonstante:

$$K' = \frac{[RH]}{[H^+]\cdot[R^-]}$$

woraus:

$$-\log K \equiv pK = \log K'$$

wobei für die Basizitätskonstante der Carboxylgruppe der Index (I), für die der Aminogruppe der Index (II) verwendet wird.

Wie aus der Titration metallhaltiger Lösungen (+ Ligand) zu ersehen ist, werden noch weitere Protonen frei. Eine Titration in 0,1 n metallfreier Lösung zeigt, dass im Falle von Fructose-Asparaginsäure, Fructose-Glycin und Glucose-Glycin im stark Alkalischen ein weiteres Proton abgegeben wird, bei der Glucosaminsäure dagegen nicht (Abb.2). Dieses zusätzliche Proton muss von einer Gruppe stammen, die saurer ist als die „normale" Kohlehydrathydroxylgruppe. Die dritte Basizitätskonstante wird hier mit dem Index (III) bezeichnet.

Tabelle 2 gibt die berechneten Basizitätskonstanten wieder.

Tabelle 2

Basizitätskonstanten der freien Liganden

Alle Titrationen bei 25,0 ± 0,5 °C in 0,1 m KCl

Ligand		$\log K'_I$	$\log K'_{II}$	$\log K'_{III}$
Fructose-Glycin		2,35 ± 0,06	8,18 ± 0,04	12,45 ± 0,03
Fructose-Asparaginsäure	a.	1,76	8,43 ± 0,06	12,75 ± 0,03
	b.	3,34 ± 0,03		
Glucose-Glycin		2,30 ± 0,06	7,42 ± 0,04	12,47 ± 0,02
Glucosaminsäure		2,40 ± 0,06	9,12 ± 0,04	

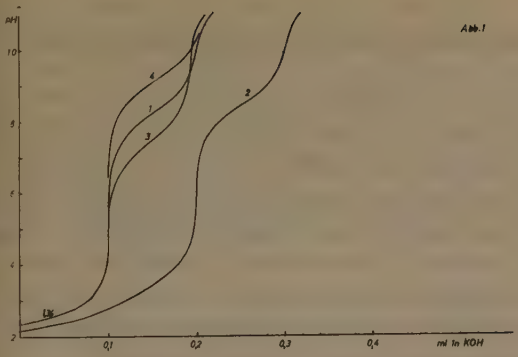


Abb.1

Potentiometrische Titration der untersuchten Liganden in 0,01 m Lösung

1 = 10^{-2} m Fructose-Glycin 2 = 10^{-2}m Fructose-Asparaginsäure
3 = $0{,}9294 \cdot 10^{-2}$m Glucose-Glycin
4 = 10^{-2}m Glucosaminsäure
[HCl] = 10^{-2}m; [KCl] = 0,1 m; V = 10,00 ml; t = 25°C

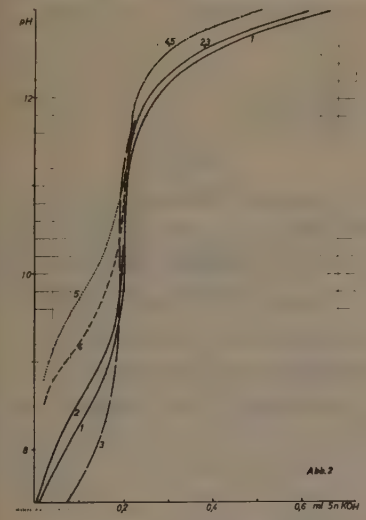


Abb.2

Potentiometrische Titration der untersuchten Liganden in 0,1 m Lösung

1 = 0,1 m Fructose-Glycin
2 = 0,1 m Fructose-Asparaginsäure x)
3 = 0,09294 m Glucose-Glycin
4 = 0,1 m Glucosaminsäure
5 = 0,1 m Glycin

V = 10,00 ml; t = 25°C

x) Fructose-Asparaginsäure mit 0,2 ml 5 n KOH vorneutralisiert.

B. Titration und Spektrophotometrie der metallhaltigen Lösungen

Im folgenden Abschnitt wird versucht aus Titrations- und Absorptionsdaten Aussagen über die Zusammensetzung der einzelnen Metallchelate in Abhängigkeit vom pH-Wert und vom Ligand:Metallverhältnis zu machen. Die ausführliche Diskussion der erhaltenen Ergebnisse soll möglichst genau die Eigenschaften der untersuchten metallhaltigen Lösungen beschreiben. Leider ist eine kürzere Angabe dieser Eigenschaften z.B. mittels Formeln und Stabilitätskonstanten noch nicht vollkommen sicher zu geben, so dass die umständliche Beschreibung gewählt werden musste.

1. Kupferkomplexe

a) Fructose-Glycin

Aus der potentiometrischen Titration bei einem Ligand : Metallverhältnis (abgekürzt L:M) = 1:1 ist eine bei recht niedrigen pH-Werten einsetzende Komplexbildung zu ersehen, und zwar schon bei pH = 2,5 (Abb.3, Kurve 2).

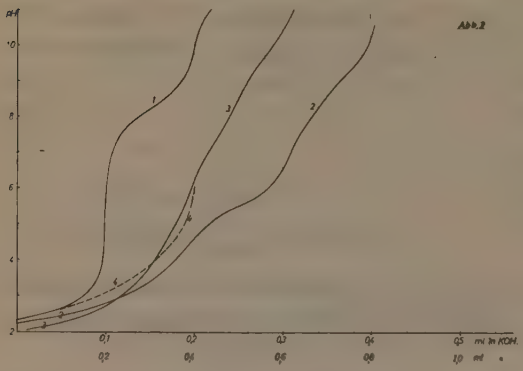


Abb.3

Potentiometrische Titration von Fructose-Glycin in Gegenwart und in Abwesenheit von Kupfer(II)chlorid.

(Als Vergleich: Glycin + Kupfer(II)chlorid)

1 = 10^{-2}m Fructose-Glycin
2 = 10^{-2}m " " + 0,9783.10^{-2}m $CuCl_2$
3 = 2.10^{-2}m " " + 0,9783.10^{-2}m $CuCl_2$ x) (untere Skala)
4 = 10^{-2}m Glycin + 0,9783.10^{-2}m $CuCl_2$

[HCl] = 10^{-2}m; [KCl] = 0,1 m; V = 10,00 ml; t = 25°C

x) [HCl] = 2.10^{-2}m

Dieser Befund wird auch durch die Spektrophotometrie gestützt (Abb.4, Kurve 1), welche auf eine beginnende Komplexbildung durch eine, im Verhältnis zur Kupfersulfatlösung erhöhte Extinktion (Abb.4, Kurve o), hinweist. Die Lage des Maximums ist die gleiche, nämlich 763 mμ, da in diesem pH-Bereich nur die Carboxylgruppe an der Komplexbildung teilnimmt. (Nach Klotz et al.[78] liegt das Absorptionsmaximum für die verschiedensten Kupferacetatkomplexe im sauren Bereich zwischen 720 und 800 mμ.)

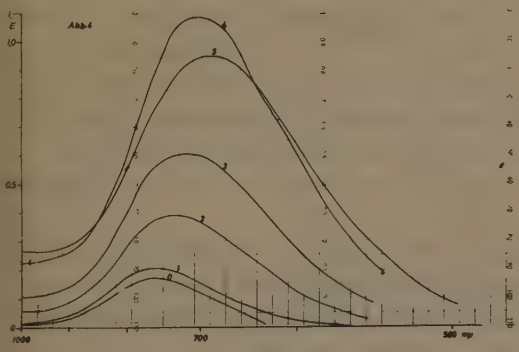


Abb.4

Absorptionskurven von Fructose-Glycin in Anwesenheit von Kupfer(II)-sulfat (L:M = 1:1) bei verschiedenen pH-Werten.

Ansatz:
$3{,}3.10^{-3}$m $CuSO_4$ +
$3{,}3.10^{-3}$m Fru-Gly.HCl
in 0,1 m KCl
V = 12,0 ml; l = 5 cm[x)]

0. $CuSO_4$ ohne Ligand 1. pH = 2,61 2. pH = 4,03
3. pH = 5,03 4. pH = 6,23 5. pH = 10,00
Die Absorptionskurven bei pH = 7,23 und pH = 8,15 sind fast identisch mit Kurve 4.

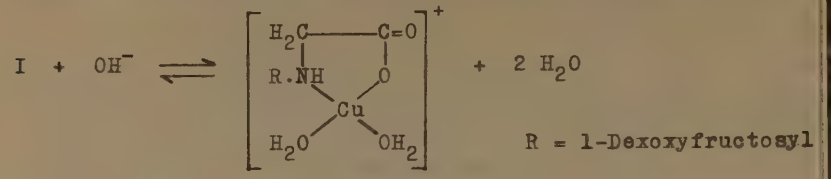
Die bei KOH-Zugabe zusätzlich (im Vergleich zur Titration des freien Liganden) freiwerdenden Protonen stammen von der Carboxylgruppe gemäss der Gleichung:

$$R.NH_2^+.CH_2.COOH + Cu(H_2O)_4^{++} \rightarrow \underset{I}{(R.NH_2^+.CH_2.COO^-)Cu^{++}(H_2O)_3} + H_3O^+$$

Bei weiterer pH-Erhöhung werden Protonen von der Ammoniumgruppe frei. Die Titrationskurve verläuft analog der für Glycin-Cu (1:1) (Abb.3, Kurve 4), nur um ca. 0,3 pH-Einheiten tiefer, was durch

x) l = Lichtweg (Näheres s. Kap.XI).

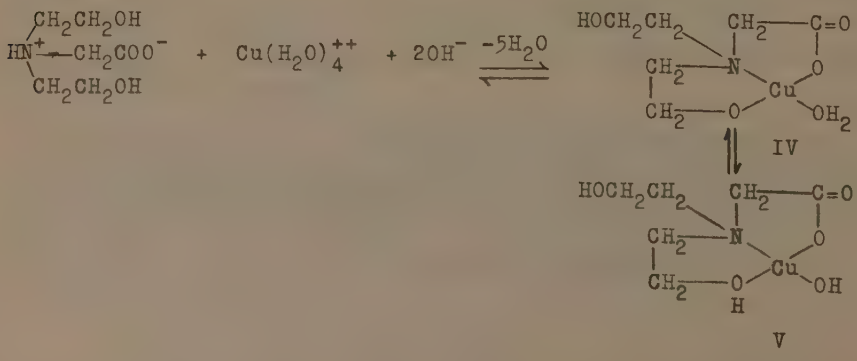
die kleinere Basizitätskonstante des Fructose-Glycins erklärt werden kann. Diesen Vorgang gibt die folgende Gleichung wieder:

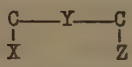


II

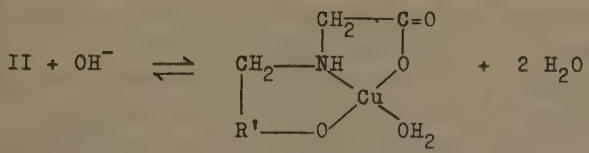
Spektrophotometrisch macht sich diese C h e l a t bildung durch Verschiebung des Maximums und Erhöhung der Extinktion bemerkbar. Bis hierher verhält sich alles wie bei einer Aminosäure mit zwei funktionellen Gruppen, z.B. Glycin[79)80)]. Titriert man jedoch Glycin + Kupfersulfat weiter (Abb.3, Kurve 4) (oder sogar eine äquimolare Lösung von Glycin und Fructose!), dann steigt das pH kurz vor Zugabe des zweiten Äquivalents Lauge stark an und es macht sich eine Trübung der Lösung bemerkbar, wobei nach längerem Stehen Kupfer(II)hydroxyd ausfällt.

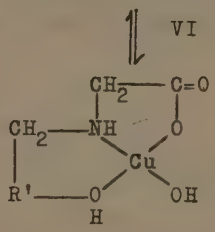
Anders verhält sich dagegen eine Lösung von Fructose-Glycin + bei weiterer KOH-Zugabe kommt es zu keiner Trübung, die Lösung bleibt vollkommen klar! Dabei werden zusätzliche Protonen frei. Aus der Literatur sind solche Phänomene bekannt. Sie treten meistens bei hydroxylhaltigen Liganden auf. Chaberek und Martell[81)] (S.72),[82)] beschreiben die Kupferchelate des N,N-Dihydroxyäthylglycins, welche eine ähnliche Protonenabgabe zeigen und denen sie die Struktur eines H y d r o x o - oder A l k o x o - Komplexes zuschreiben, wobei diese Formeln in einem tautomeren Gleichgewicht miteinander stehen sollen gemäss der Formulierung (IV) ⇌ (V):



In Analogie zu dieser Formulierung kann man auch die Metallchelate der Amadori- und Heynsverbindungen formulieren, wobei zu beachten ist, dass sowohl diese als auch das N,N-Dihydroxyglycin zum gleichen Typ von Liganden gehören, dem Schwarzenbach die Bezeichnung  gibt[83] (Näheres s. S. 56).

Im Bereich des dritten Äquivalents Lauge kann man die Chelatbildung zwischen Fructose-Glycin und Kupfer(II)ionen wie folgt formulieren:





VI

VII

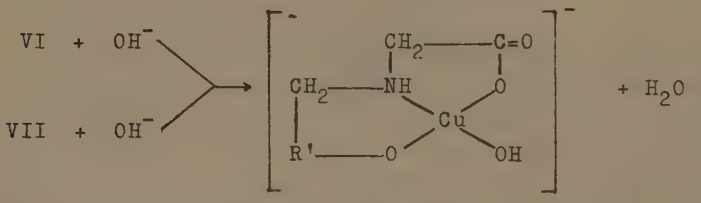
R' - deutet den Rest des Fructose-Glycinmoleküls an, dessen eine Hydroxylgruppe an der Komplexbildung teilnimmt (Näheres s. Kap. IX).

Die in diesen Formeln zum Ausdruck gebrachte Koordination einer Hydroxylgruppe des Liganden kann schon bei einem tieferen pH stattgefunden haben, ohne dass es zu einer Protonabspaltung kam. Die potentiometrische Titration gestattet leider nur die Verfolgung von Vorgängen, die mit Protonenabspaltung einhergehen.

Spektrophotometrisch zeichnet sich dieser Abschnitt durch einen steilen Anstieg der Extinktion aus, was auf eine starke Koordination eines Sauerstoffatoms an das zentrale Cu-Ion deutet. Die Extinktion erreicht bei pH = 6,23 fast ihr Maximum, dann steigt sie nur noch wenig an. Das steht in Einklang mit der bekannten Tatsache, dass mit einer Vergrösserung der Anzahl der c h e l a t-

gebundenen Gruppen starke Absorptionseffekte einhergehen. Sowohl spektrophotometrische Messungen wie auch die Titrationskurve deuten auf eine C h e l a t bindung hin, d.h. sprechen für eine hohe Beteiligung der Struktur VI am tautomeren Gleichgewicht VI $\rightleftharpoons$ VII .

Im letzten Teil der Titrationskurve, zwischen dem 3. und 4. Äquivalent KOH, verschiebt sich das Extinktionsmaximum zu kürzeren Wellenlängen hin und die Extinktion hält ein wenig ab. Diese Befunde kann man durch die Abspaltung eines Protons deuten, wobei die Anzahl der chelatgebundenen Gruppen (= 3) nicht vergrössert wird und nur eine geringe Veränderung der komplexgebundenen Gruppen stattfindet. Diese kleinen Veränderungen in der Ligandsphäre rufen keine grossen Veränderungen im Spektrum des Chelates, das ein „verändertes" Spektrum des Zentralatoms ist, hervor. Das abgespaltene Proton stammt entweder aus dem assoziierten Wassermolekül oder aus der Hydroxyl-gruppe des Liganden:



VIII

Im Falle eines Ligandüberschusses (L:M = 2:1) wird die Auswertung der Titrationskurve (Abb.3, Kurve 3) dadurch kompliziert, dass sowohl(1:1), als auch (2:1) Chelate gebildet werden können. Mit Hilfe der potentiometrischen Titration ist nicht zu entscheiden, ob (1:1) oder (2:1) Chelate gebildet werden, weil sich die Bereiche, in denen Protonen vom Übergang II $\rightarrow$ VI bzw. VII und vom freien Liganden frei werden, überschneiden. Aus den spektrophotometrischen Daten (Abb.5) darf geschlossen werden, dass hauptsächlich (1:1) Chelate entstehen. Das Absorptionsmaximum liegt in diesem Fall für den pH-Bereich von pH = 5 bis pH = 10 zwischen 690 und 700 mμ, also im gleichen Bereich wie beim (1:1) Chelat. Wie später gezeigt wird, bildet Glucosaminsäure einen (2:1) Komplex, dessen Absorptions-

maximum bei 610 mμ liegt (das gleiche Maximum zeigt der Glycin-Kupferkomplex, der nach Klotz et al.[78] bei 600-620 mμ maximal absorbiert). Vergleicht man die Absorptionskurven für Fructose-Glycin-Kupfer - und Glucosaminsäure - Kupfer-Komplexe (Abb.14), dann sieht man sofort den grossen Unterschied im Charakter der Absorptionskurven!

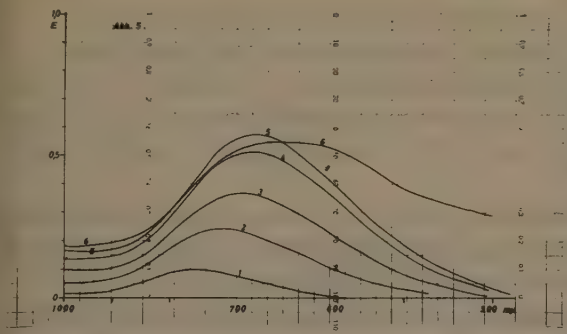


Abb.5

Absorptionskurven von Fructose-Glycin in Anwesenheit von Kupfer(II)-sulfat (L:M = 2:1) bei verschiedenen pH-Werten.

Ansatz:
$1{,}65.10^{-3}$m $CuSO_4$ +
$3{,}3.10^{-3}$ m Fru-Gly.HCl
in 0,1 m KCl
V = 12,0 ml; l = 5 cm

1. pH = 2,60 2. pH = 4,05 3. pH = 5,03
4. pH = 6,0 5. pH = 7,23 6. pH = 10,0
Die Absorptionskurve bei pH = 8 ist identisch mit Kurve 5.
Bei pH = 10 leichte Trübung (!).

Diesen Unterschied zwischen (1:1) und (2:1) Chelat kann man schon während der Titration beobachten: Fructose-Glycin-Kupferlösungen zeigen immer eine grüne bis blaugrüne Farbe, Glucosaminsäure-Kupferlösungen haben bei Glucosaminsäure-Überschuss bei höheren pH-Werten eine prächtig blaue (bis violettblaue) Farbe, genau so wie Glycin-Kupferlösungen.

b) Fructose-Asparaginsäure

Nachdem die Fructose-Glycin-Kupferchelate ausführlich diskutiert wurden, sollen im folgenden nur kurze Erläuterungen der potentiometrischen und spektrophotometrischen Ergebnisse gegeben werden.

Die Analogie zwischen Fructose-Glycin und Fructose-Asparaginsäure ist im Hinblick auf eine Komplexbildung mit Kupfer(II)-

ionen sehr weitgehend, da sich letzteres vom ersteren nur durch eine Carboxylgruppe unterscheidet. Wie die Arbeiten von Chaberek und Martell[84] zeigen, ist diese Carboxylgruppe an der Komplexbildung zwischen Asparaginsäure und Kupferionen nicht beteiligt, weil in einem dreizähnigen Chelat die Amino- und die beiden Carboxylgruppen die planaren Koordinationsstellen ohne grosse Spannung nicht besetzen können.

In Analogie zu den spektrophotometrischen Messungen an Glycin-Kupferkomplexen zeigen die Ergebnisse von Kirson und Barsily[85] für den Asparaginsäure-Kupfer (1:1) Komplex, der unter pH = 4 beständig ist, ein Absorptionsmaximum von 700-710 mμ; für den(2:1) Komplex, der bei pH = 6 beständig ist, ein Maximum von 620 mμ.

Aus den Titrationskurven (Abb.6) und dem Spektrogramm (Abb.7) ist auch die grosse Ähnlichkeit zwischen Fructose-Glycin und Fructose-Asparaginsäure zu sehen: von 0-2 Äquivalenten KOH findet eine Komplexbildung zwischen den Carboxylgruppen und dem Kupferion statt, das Maximum ist mit 740 mμ ins Kürzerwellige verschoben, weil die Komplexbildung infolge statistischer Effekte (zweite Carboxylgruppe!) weiter fortgeschritten ist.

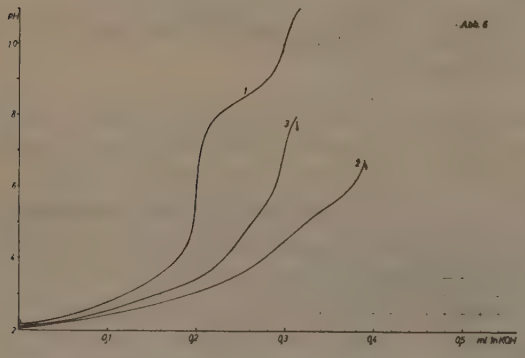


Abb.6

Potentiometrische Titration von Fructose-Asparaginsäure in Gegenwart und Abwesenheit von Kupfer(II)chlorid.

1 = 10^{-2}m Fructose-Asparaginsäure
2 = 10^{-2}m " " + 0,9783.10^{-2}m $CuCl_2$
3 = 10^{-2}m " " + 0,4892.10^{-2}m $CuCl_2$
[HCl] = 10^{-2}m; [KCl] = 0,1 m; V = 10,00 ml; t = 25°C

Zwischen dem 2. und 3. Äquivalent KOH macht ein leichter Knick in der Titrationskurve auf eine Beteiligung der Aminogruppe aufmerksam. Nach dem 3. Äquivalent KOH entsteht ein dreizähniges Chelat, worauf das Spektrogramm (Abb.7) aufmerksam macht .

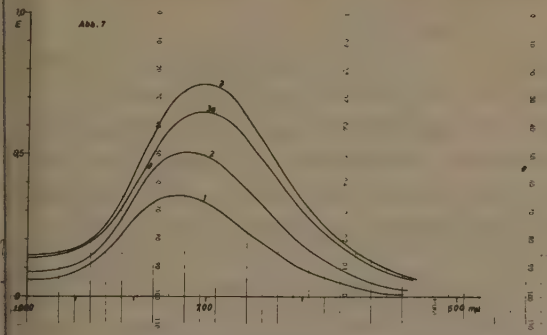


Abb.7

Absorptionskurven von Fructose-Asparaginsäure in Anwesenheit von Kupfer(II)sulfat (L:M=1:1) bei verschiedenen pH-Werten.

Ansatz:
$3{,}30.10^{-3}$m $CuSO_4$ +
$3{,}3.10^{-3}$ m Fru-Asp.
in 0,1 m KCl
V = 12,0 ml; 1 = 5 cm

1. pH = 2,72 2. pH = 3,95
3. pH = 5,0 3a. Ansatz 3. ca. 10 Minuten später

Vor Erreichen des 4. Äquivalenzpunktes macht sich eine Trübung der Lösung bemerkbar (bei pH = 6,75), die immer dichter wird und von gelbgrüner Farbe ist. Nach ca. 1 Stunde hat sich am Boden ein ziegelroter Niederschlag von Kupfer(I)oxyd abgesetzt.

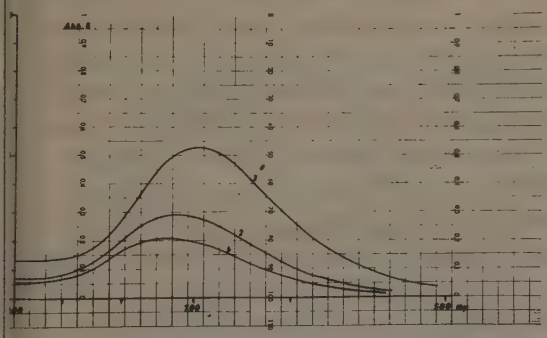


Abb.8

Absorptionskurven von Fructose-Asparaginsäure in Anwesenheit von Kupfer(II)-sulfat (L:M=2:1) bei verschiedenen pH-Werten.

Ansatz:
$1{,}65.10^{-3}$m $CuSO_4$ +
$3{,}3.10^{-3}$ m Fru-Asp.
in 0,1 m KCl
V = 12,0 ml; 1 = 5 cm

1. pH = 2,81 2. pH = 4,05 3. pH = 5,48

Aus dem (2:1)-Ansatz (Titration Abb.6, Spektrogramm Abb.8) ist zu ersehen, dass Fructose-Asparaginsäure analog zu Fructose-Glycin vorwiegend (wenn nicht ausschliesslich) ein (1:1) Chelat bildet.

Die Struktur dieser Komplexe ist analog zu denen des Fructose-Glycins (s.S.22-24) zu formulieren; die β-Carboxylgruppe ist an der Komplexbildung nicht beteiligt.

Zwischen Fructose-Glycin und Fructose-Asparaginsäure besteht jedoch ein gewisser Unterschied: es ist nie gelungen Fructose-Asparaginsäure in Gegenwart von Kupfer(II)ionen auf ein höheres pH als 7 zu bringen, ohne dass ein Niederschlag ausfiel, wogegen Fructose-Glycin auf pH = 10 (und höher) ohne Niederschlagsbildung gebracht werden konnte. Diese Unterschiede werden ausführlicher in Kap.IX diskutiert.

Es sei noch darauf aufmerksam gemacht, dass Fructose-Asparaginsäure schon bei pH = 5 Kupfer(II)ionen zu Kupfer(I)ionen reduziert, was von v.Euler und Eistert[86] als Kriterium für Reduktone-Struktur angenommen wird. Diese Reduktionswirkung kann man durch spektrophotometrische Veränderungen schon frühzeitig erkennen.

c) Glucose-Glycin

Die titrimetrischen (Abb.9) und spektrophotometrischen Ergebnisse (Abb.10,11) zeigen, dass eine weitgehende Analogie zwischen den chelierenden Eigenschaften von Fructose-Glycin und Glucose-Glycin besteht, weswegen hier auf die Formeln auf Seite 22-25 verwiesen sei. Im Falle des Glucose-Glycins kann die an der Chelatbildung beteiligte Hydroxylgruppe am ersten Kohlenstoffatom (glycosidische Hydroxylgruppe), oder am dritten Kohlenstoffatom sitzen, wie entsprechende Modellbetrachtungen zeigen. Es wird angenommen, dass sich diese Hydroxylgruppen in Bezug auf ihre Basizitätskonstante unterscheiden: die OH-Gruppe an C_1 ist (in Analogie zum Fructose-Glycin) saurer als die an C_3. Deshalb ist eine bevorzugte Beteiligung der C_1-OH Gruppe anzunehmen. Die Betrachtung der Titrationskurve zeigt, dass beim Glukose-Glycin-(1:1)-Kupferkomplex eine deutliche Stufe zwischen dem zweiten und dritten Äquivalent KOH zu sehen ist, die durch die niedrigere Basizitätskonstante der Aminogruppe des Glucose-Glycins und eine schwierigere Abspaltung des Hydroxyl-Protons zustande kommt.

Damit in Einklang steht auch eine stärkere Verschiebung des Absorptionsmaximums zu kürzeren Wellenlängen hin (Abb.10, Kurve 1). Sonst aber ist das Spektrum des Glucose-Glycins dem des Fructose-Glycins in Anwesenheit von Kupferionen zum Verwechseln ähnlich.

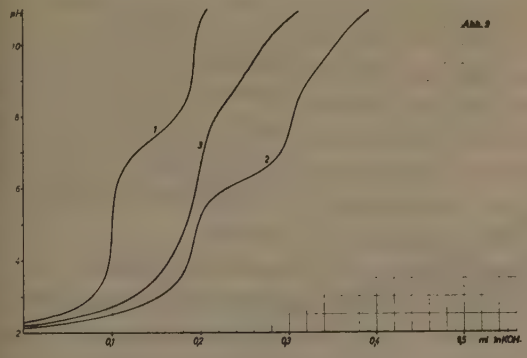


Abb.9

Potentiometrische Titration von Glucose-Glycin in Gegenwart und Abwesenheit von Kupfer(II)chlorid.

1 = $0{,}9294.10^{-2}$m Glucose-Glycin
2 = $0{,}9294.10^{-2}$m " + $0{,}9783.10^{-2}$m $CuCl_2$
3 = $0{,}9294.10^{-2}$m " + $0{,}4892.10^{-2}$m $CuCl_2$
[HCl] = 10^{-2}m; [KCl] = 0,1 m; V = 10,00 ml; t = 25°C

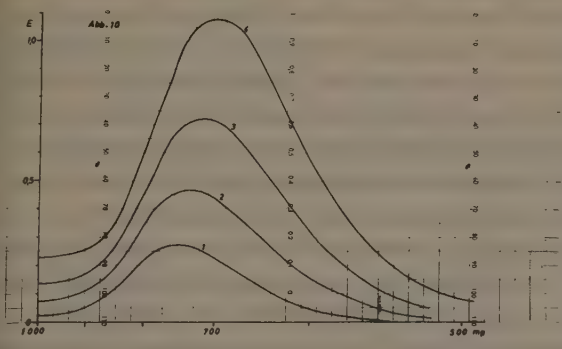


Abb.10

Absorptionskurven von Glucose-Glycin in Anwesenheit von Kupfer(II)-sulfat (L:M=1:1) bei verschiedenen pH-Werten.

Ansatz:
$3{,}3.10^{-3}$m $CuSO_4$ +
$3{,}05.10^{-3}$m Gluc-Gly.HCl
in 0,1 m KCl
V = 12,0 ml; l = 5 cm

1. pH = 2,50 2. pH = 3,95 3. pH = 6,00 4. pH = 7,25
Messung bei pH = 9,20 und pH = 10,15, fast identisch mit Kurve 4.

Sehr aufschlussreich für das Verständnis der Komplexbildun der untersuchten Liganden ist der (2:1)-Ansatz: Abb.9, Kurve 3 und Abb.11.

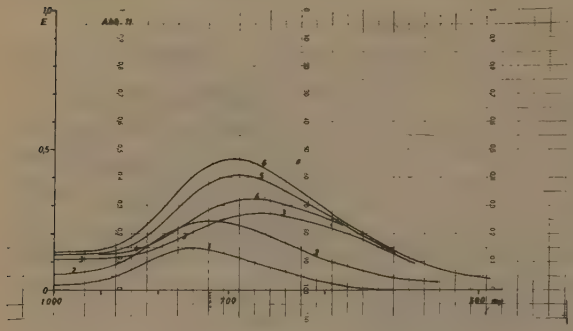


Abb.11

Absorptionskurven von Glucose-Glycin in Gege wart von Kupfer(II)sul fat (L:M=2:1) bei ver- schiedenen pH-Werten.

Ansatz:
$1{,}65.10^{-3}$m $CuSO_4$ +
$3{,}05.10^{-3}$m Gluc-Gly.HC
in 0,1 m KCl
V = 12,0 ml; l = 5 cm

1. pH = 2,60 2. pH = 4,00 3. pH = 6,05
4. pH = 7,25 5. pH = 8,20 6. pH = 9,20
Die Kurve bei pH = 10 ist fast identisch mit 6.

Aus dem Spektrogramm ist zu ersehen, dass bei niedrigen pH-Werten die Komplexbildung völlig analog zum Fructose-Glycin verläuft: es bildet sich zunächst ein Komplex zwischen Carboxyl- gruppe und Kupferion in Analogie zur Formel (I) S.22; infolge des grösseren Angebots an Glucose-Glycin können auch zwei Carb- oxylgruppen an der Komplexbildung teilnehmen. Erhöht man das pH (über 2,75), dann findet eine Koordination einer Aminogruppe statt, das Absorptionsspektrum unterscheidet sich nur unwesent- lich (Formel II, S.23, eventuell mit zwei Carboxylgruppen).

Bei weiterem Erhöhen des pH-Wertes findet eine starke Ver- schiebung des Absorptionsmaximums bis λ = 665 mμ, also in einen Bereich, der für einen 2:1-Aminosäurekomplex (mit zwei koordi- nierten N-Atomen) charakteristisch ist, statt. Aller Wahrschein- lichkeit nach ist hier ein 2:1-Komplex entstanden, den man analo zu dem Glucosaminsäurekupferkomplex (S. 35) formulieren kann.

Das Glucose-Glycin verhält sich hier anders als das Fructos Glycin aus zwei Gründen: erstens ist die Basizitätskonstante der Aminogruppe des Glucose-Glycins (log K_{II}) niedriger als die

von Fructose-Glycin (s.S.19). Das bedeutet, dass die Aminogruppe des Glucose-Glycins ihr Proton in Gegenwart eines Metallions bei einem niedrigeren pH abgibt als Fructose-Glycin; zweitens dissoziiert ein Proton von der Hydroxylgruppe des Glucose-Glycins in Gegenwart von Metallionen schwieriger ab als im Falle von Fructose-Glycin. Wir haben es hier also mit einer Konkurrenzreaktion zwischen der Aminogruppe und der Hydroxylgruppe zu tun. D i e j e n i g e Gruppe wird an das Kupferion gebunden, die ihr Proton leichter abgeben kann. In Abwesenheit von Metallionen ist das immer die Aminogruppe, wie die Titration der freien Liganden (S.19) zeigt. In Anwesenheit von Kupfer(II)ionen kann es aber anders sein, wie die Beispiele der Kupferchelate des Fructose-Glycins und Glucose-Glycins zeigen. Bei Fructose-Glycin dissoziiert leichter ein Proton von einer Hydroxylgruppe des schon gebundenen Moleküls ab, als dass ein zweites Molekül gebunden wird. Dieser Befund weist darauf hin, dass immer dort, wo dreizähnige (1:1) Komplexe gebildet werden können, diese infolge des Chelateffektes bevorzugt entstehen. Beim Glucose-Glycin entsteht also zunächst ein (2:1) Komplex, weil die Aminogruppe ihr Proton bei einem sehr niedrigen pH abgeben kann.

Erhöht man jedoch das pH, dann sieht man an Hand der Absorptionskurven, dass das Maximum eine Rotverschiebung erleidet: es beträgt bei pH $\geq$ 8,20 690-700 mμ, was einem (1:1) Komplex entspricht. Das heisst aber, dass hier (im Gegensatz zu dem was normal bei Aminosäuren und bei der Glucosaminsäure beobachtet wird) eine Umwandlung des (2:1) Komplexes in das (1:1) Chelat stattfindet! Der Grund für dieses Verhalten wurde schon angegeben: (1:1) Chelate entstehen vor (2:1) Komplexen. Die bei niedrigen pH-Werten nicht konkurrenzfähige Hydroxylgruppe hat bei höheren pH-Werten die Möglichkeit ihr Proton abzugeben und an das Kupfer(II)ion gebunden zu werden.

Erwähnt sei noch die Beobachtung, dass sich in alkalischen, kupferionenhaltigen Glucose-Glycinlösungen (pH $\geq$ 10) nach längerem Stehen am Boden ein ziegelroter Niederschlag von Kupfer(I)-oxyd bildet - ein weiterer Beweis für die Analogie zwischen Glucose-Glycin und Fructose-Glycin.

d) Glucosaminsäure

Den bisher besprochenen Komplexbildnern war das allgemeine Bauprinzip gemeinsam (S.24). Von diesem Typ ist bekannt, dass er leicht (1:1)Chelate bildet. Die Glucosaminsäure gehört jedoch einem andern Bauprinzip, dem Typ an, der, obwohl potentiell ein dreizähniger Ligand, aus sterischen Gründen meist nur zwei Ligandatome koordinativ betätigen kann und deshalb vorwiegend (2:1) Komplexe bildet.

Aus der Titrationskurve (Abb.12, Kurve 2, L:M=1:1) ist zu ersehen, dass ein (1:1) Chelat bei pH > 6 gebildet wird, weil oberhalb von pH = 6 Kupferhydroxyd ausfällt. Der gebildete Komplex ist also recht instabil und zerfällt bei einem höheren Angebot an OH^-Ionen. Das Absorptionsmaximum dieses (1:1)Chelates liegt bei ca. 700 mμ, wie in den vorangegangenen Fällen (Abb.13).

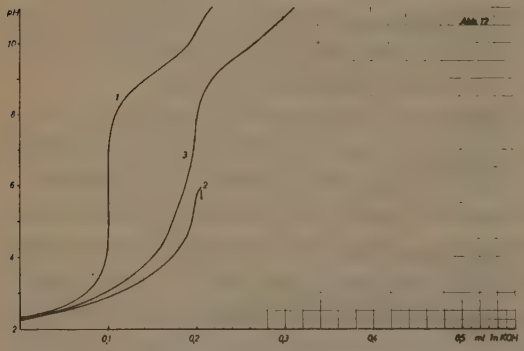


Abb.12

Potentiometrische Titration von Glucosaminsäure in Gegenwart und Abwesenheit von Kupfer(II)-chlorid.

1 = 10^{-2}m Glucosaminsäure
2 = 10^{-2}m " + $0{,}9783.10^{-2}$ m $CuCl_2$
3 = 10^{-2}m " + $0{,}4892.10^{-2}$ m $CuCl_2$

[HCl] = 10^{-2}m; [KCl] = 0,1 m; V = 10,00 ml; t = 25°C

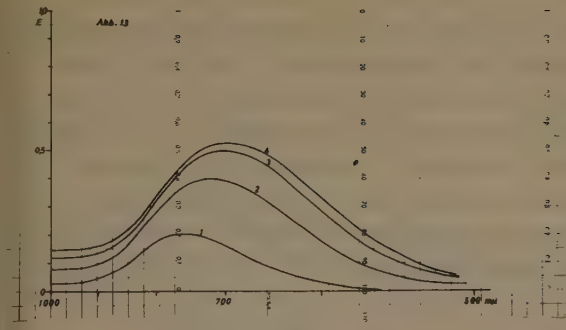


Abb.13

Absorptionskurven von Glucosaminsäure in Gegenwart von Kupfer(II)-sulfat (L:M=1:1) bei verschiedenen pH-Werten.

Ansatz:
$3{,}3.10^{-3}$m $CuSO_4$ +
$3{,}3.10^{-3}$m GAS.HCl in
0,1 m KCl
V = 12,0 ml; l = 5 cm

1. pH = 2,65 2. pH = 4,05 3. pH = 5,15 4. pH = 6,10

Die spektrophotometrische Untersuchung bei einem (2:1) Verhältnis von Ligand zu Metall ist sehr aufschlussreich (Abb.14).

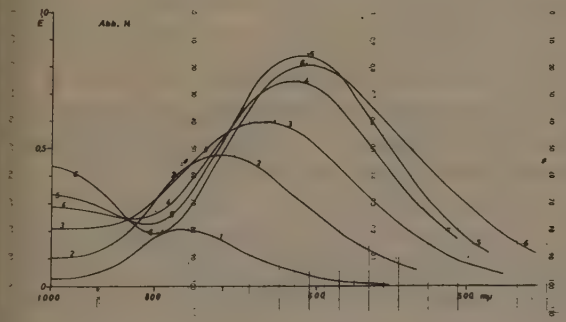


Abb.14

Absorptionskurven von Glucosaminsäure in Gegenwart von Kupfer(II)-sulfat (L:M=2:1) bei verschiedenen pH-Werten.

Ansatz:
$1{,}65.10^{-3}$m $CuSO_4$ +
$3{,}3.10^{-3}$ m GAS.HCl in
0,1 m KCl
V = 12,0 ml; l = 5 cm

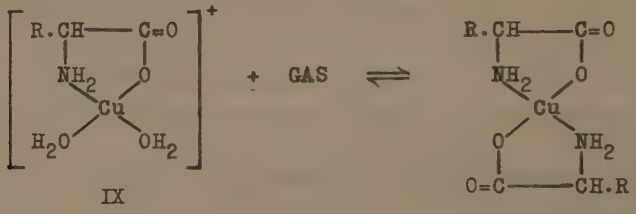
1. pH = 2,43 2. pH = 4,00 3. pH = 5,00
4. pH = 6,03 5. pH = 7,22 6. pH = 10,03

Messung bei pH = 8,34 fast identisch mit Kurve 5.

Wie bei den früher besprochenen Liganden ist bei pH < 4 der (1:1) Komplex mit einem Absorptionsmaximum von 700 mμ beständig. Der Laugeverbrauch bei pH = 4 beträgt 1,5 Äquivalente KOH[x)],

x) es werden immer Äquivalente KOH pro Mol Ligand angegeben.

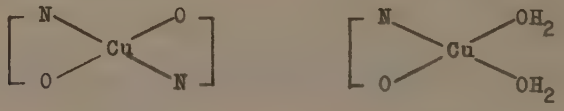
dem entstandenen Chelat kann man also die Formel IX zuschreiben. Bei weiterer KOH-Zugabe tritt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums ins Kürzerwellige ein: es bildet sich ein (2:1) Komplex (X), bis zwei Aequivalente Lauge verbraucht sind. In diesem pH-Bereich gehen alle Absorptionsspektren durch zwei isosbestische Punkte. Das Auftreten von isosbestischen Punkten ist für eine einfache Reaktion vom Typ: $aA \rightleftharpoons bB$ beweisend, wobei Neben- und Folgereaktionen ausgeschlossen sind[87]. Im untersuchten Fall ist das der folgende Übergang:



IX X

R = Rest des Glucosaminsäuremoleküls.

Die Anwesenheit der isosbestischen Punkte beweist, dass aus IX ausschliesslich X entsteht. Das Absorptionsmaximum bei 610 mμ ist also für den Glucosaminsäure-Kupfer (2:1)-Komplex charakteristisch; allgemein für den (2:1) Komplextyp XI:



XI XII

Aus der Theorie der isosbestischen Punkte[87] folgt weiter, dass bei einem einfachen $aA \rightarrow bB$ Übergang die folgende Gleichung erfüllt sein muss:

$$a \cdot \varepsilon_A = b \cdot \varepsilon_B$$

a,b, - Koeffizienten der stöchiometrischen Gleichung

$\varepsilon_A, \varepsilon_B$ - molare Extinktionskoeffizienten

Da in diesem Fall a=b ist, muss $\varepsilon_A = \varepsilon_B$ sein, d.h. die molaren Extinktionskoeffizienten sind für den (1:1) und (2:1) Komplex

bei 700 mμ gleich. Bei dieser Wellenlänge liegt jedoch das Absorptionsmaximum des (1:1) Komplexes. Nimmt aber dieser Komplex noch ein zweites Ligandmolekül auf, so verändert sich sein molarer Extinktionskoeffizient bei 700 mμ nicht. Das Absorptionsmaximum bei 700 mμ ist also für den Komplextyp XII charakteristisch, denn dieser Typ ist auch im (2:1) Komplex enthalten. Im (2:1) Komplex tritt noch zusätzlich eine Absorption bei 610 mμ auf. In diesem Fall erfolgt die Absorption bei gewissen charakteristischen Wellenlängen, die voneinander unabhängig sind.

Bei weiterer KOH-Zugabe tritt noch zusätzlich ein Puffergebiet auf, in welchem Protonen frei werden. Diese Protonen können von den Hydroxylgruppen der Glucosaminsäure stammen, wobei bei gleichbleibender Koordinationszahl des Kupfer(II)ions (die gleich vier ist) eine Umlagerung des Komplexes stattfinden muss. Der Komplex bleibt aber ein (2:1) Komplex, wie das Absorptionsmaximum zeigt. Aller Wahrscheinlichkeit nach befindet sich die zusätzlich gebundene Hydroxylgruppe am C-Atom 3 des Glucosaminsäuremoleküls.

2. Zinkkomplexe

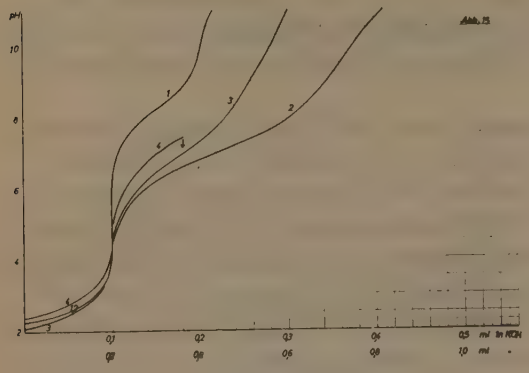
Zinkionen haben in den meisten Fällen die Koordinationszahl vier; diese Verbindungen bilden reguläre Tetraeder, in deren Mitte das Zinkion steht[88]. In wässriger Lösung bindet das zweiwertige Zinkion vier Wassermoleküle, die durch andere Liganden ersetzt werden können. Die Formeln der Zinkchelate, die im folgenden diskutiert werden, unterscheiden sich in den Projektionsformeln nicht von den besprochenen Kupferchelaten, weswegen auf die vorhergehenden Formelbilder verwiesen wird.

a) Fructose-Glycin

Es sei vorweggenommen, dass Fructose-Glycin und Fructose-Asparaginsäure (Amadori-Verbindungen) die einzigen unter den untersuchten Substanzen sind, die Zinkionen im Verhältnis (1:1) bis pH = 11 zu binden vermögen, ohne dass ein Zinkhydroxydniederschlag ausfällt. Bei pH = 11 sind dann alle vier Wassermoleküle des Zinkions durch andere Liganden ersetzt. Die potentio-

metrische Titration wurde nur bis pH = 11 geführt. Durch Laugenzugabe kann man sich überzeugen, dass die Zinkchelate der Amadori-Verbindungen auch bei höheren pH-Werten noch keinen Niederschlag geben.

Die Ergebnisse der potentiometrischen Titration gibt Abb.15 wieder:



A

Abb.15

Potentiometrische Titration von Fructose-Glycin in Gegenwart und Abwesenheit von Zinksulfat. (Als Vergleich: Glycin + $ZnSO_4$)

1 = 10^{-2}m Fructose-Glycin

2 = 10^{-2}m " + 10^{-2}m $ZnSO_4$

3 = 2.10^{-2}m " + 10^{-2}m $ZnSO_4$ (untere Skala)[x)]

4 = 10^{-2}m Glycin + 10^{-2}m $ZnSO_4$

[HCl] = 10^{-2}m; [KCl] = 0,1 m; V = 10,00 ml; t = 25°C

Die Bindung der Zinkionen spielt sich nach der potentiometrischen Titration (und den früher gesammelten Erfahrungen) folgendermassen ab: im stark sauren Bereich verläuft die Titrationskurve von Fructose-Glycin in Gegenwart und in Abwesenheit von Zinkionen identisch (wenn man die bemerkbare zweite Dissoziationsstufe der Schwefelsäure in Betracht zieht). Zinkionen sind offensichtlich nicht in der Lage Protonen von der Carboxylgruppe abzuspalten. Es darf jedoch angenommen werden, dass die negativ geladene Carboxylgruppe infolge ihrer Ladung bevorzugt (im Verhältnis zu Wassermolekülen) an das Zinkion gebunden wird (entspricht der Formel I S.22). Die gebundene Carboxylgruppe erleichtert durch den C h e l a t effekt (sterischer Effekt!) die darauf folgende Bindung der Aminogruppe, wobei die Bindungstendenz so stark ist, dass die Ammoniumgruppe bei einem niedrigeren pH Protonen ab-

x) [HCl] = 2.10^{-2}m

spaltet, als es ihrer Dissoziationskonstante entspricht. Der geschilderte Vorgang kann durch eine zu (II, S.23) analoge Formel wiedergegeben werden.

Das gebildete Chelat (II-Zn) ist bei weiterer Erhöhung des pH-Wertes in der Lage, Protonen abzuspalten, welche, wie im Falle der Kupferchelate entweder den Hydroxylgruppen des Liganden und/oder den koordinierten Wassermolekülen entstammen können (Vorgang: II → VI, VII S.24). Es kann schliesslich noch ein Proton abgespalten werden, analog dem Vorgang VI, VII → VIII (S.25).

Die hier angestellten Betrachtungen sind in der Lage, die Alkalibeständigkeit der Amadori-Metallkomplexe zu erklären. Aus dem unterschiedlichen Verhalten von Amadori-Verbindungen, Heyns-Verbindungen und Glucosaminsäure gegenüber Zinkionen darf geschlossen werden, dass aller Wahrscheinlichkeit nach die Carbonylgruppe am Kohlenstoffatom 2 der Amadori-Verbindungen für die Metallionenbindung verantwortlich ist.

Erhöht man das Verhältnis von Ligand zu Metall auf (2:1) (Abb.15, Kurve 3), dann erhält man ein anderes Bild: im ersten Teil der Titrationskurve werden wie beim (1:1)-Verhältnis keine zusätzlichen Protonen frei. Danach setzt die Deprotonisierung der Ammoniumgruppe ein, und es bildet sich (zu einem gewissen Teil wenigstens) ein (2:1)-Komplex. Damit dürfte die Komplexbildung abgeschlossen sein, da alle vier Koordinationsstellen des Zinkions besetzt sind. So verhalten sich auch die Metallkomplexe der neutralen Aminosäuren: die abgeschlossene Komplexbildung wird durch einen steilen Anstieg der Titrationskurve angedeutet. Darauf folgt meistens ein waagerechter Abschnitt, wobei früher oder später Zinkhydroxyd ausfällt. Diese Tatsache kann durch eine Verdrängung der Carboxylgruppe durch die Hydroxylionen der Lauge gedeutet werden. Die dabei entstehenden Hydroxokomplexe erleiden unter Wasseraustritt eine Polymerisation zu unlöslichem Zinkhydroxyd. Die Tatsache, dass Hydroxylionen die Carboxylionen verdrängen, ist nicht weiter verwunderlich, da allgemein eine Parallelität zwischen Basizitätskonstante und Stabilitätskonstante besteht. Die Basizitätskonstante von Wasser und Alkoholen ist bekanntlich sehr viel höher als die von Carbonsäuren.

Im Falle der Amadori-Metallkomplexe besteht auch die Möglichkeit einer Verdrängung der Carboxylgruppe durch die Hydroxylionen der Kalilauge, was zum Zinkhydroxydniederschlag führen müsste. Man beobachtet zwar einen KOH-Verbrauch, aber nicht die geringste Trübung, die bei Aminosäuren unter den gleichen Verhältnissen sehr deutlich auftritt. Auch die typischen pH-Schwankungen kurz vor dem Auftreten der Trübung fehlen hier gänzlich. Diese Beobachtungen können am einfachsten durch eine Beteiligung der Hydroxylgruppen des Fructose-Glycinmoleküls an der Komplexbildung gedeutet werden. Die koordinierten OH-Gruppen müssen dabei zwei Bedingungen erfüllen:

α) sie müssen räumlich so gelagert sein, dass eine Koordinierung möglich ist,

β) sie müssen ihr Proton rechtzeitig abgeben, um so vor der Konkurrenz der negativen Hydroxylionen der Lösung sicher zu sein.

Bei Amadori-Verbindungen sind beide Bedingungen erfüllt (anders ist es z.B. beim Glucose-Glycin in Gegenwart von Zinkionen).

b) Fructose-Asparaginsäure

Die Ergebnisse der potentiometrischen Titration sind in Abb.16 wiedergegeben.

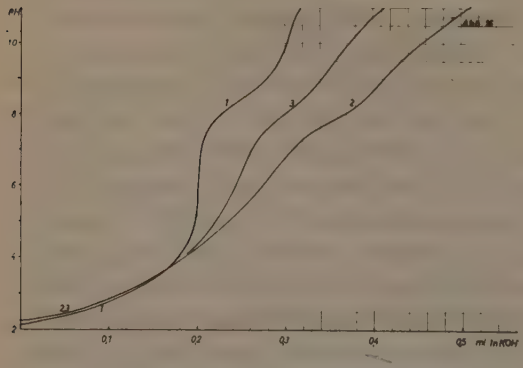


Abb.16

Potentiometrische Titration von Fructose-Asparaginsäure in Gegenwart und Abwesenheit von Zinksulfat.

1 = 10^{-2}m Fructose-Asparaginsäure

2 = 10^{-2}m " + 10^{-2}m $ZnSO_4$

3 = 10^{-2}m " + 5.10^{-3}m $ZnSO_4$

[HCl] = 10^{-2}m; [KCl] = 0,1 m; V = 10,00 ml; t = 25°C

Fructose-Asparaginsäure bildet infolge der Anwesenheit einer zusätzlichen Carboxylgruppe stabilere Zinkkomplexe als Fructose-Glycin. Sonst verhalten sich die Zinkchelate analog zu denen des Fructose-Glycins, wie das schon bei den Kupferchelaten festgestellt wurde.(S.26).

c) Glucose-Glycin

Obwohl man dem Glucose-Glycin eine Iminodiessigsäurestruktur (s.S.24) zuschreiben darf, liegt hier der bemerkenswerte Fall vor, dass bei der Titration einer äquimolaren Lösung von Glucose-Glycin und Zinkionen bei pH ≅ 8 ein Niederschlag von Zinkhydroxyd ausfällt. Dieser Niederschlag fällt aber, im Vergleich zu analogen Titrationen von Glycin, bei denen er nach Überschreiten des zweiten Äquivalenzpunktes sofort entsteht, relativ spät aus. In diesem Fall überwiegt die Hydroxokomplexbildung über die Alkoxokomplexbildung. Erhöht man jedoch das Verhältnis von Ligand zu Metall auf 2:1 (Abb.17, Kurve 2), dann tritt kein Niederschlag auf, im Gegensatz zu Glycin, bei dem eine Zinkhydroxydfällung auch bei einem 2:1-Verhältnis beobachtet wird.

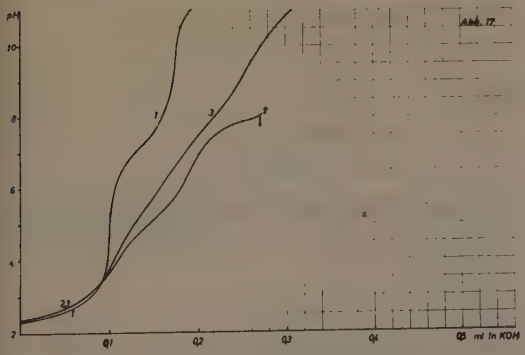


Abb.17

Potentiometrische Titration von Glucose-Glycin in Gegenwart und Abwesenheit von Zinksulfat.

1 = $0{,}9294.10^{-2}$m Glucose-Glycin
2 = $0{,}9294.10^{-2}$m " + 10^{-2}m $ZnSO_4$
3 = $0{,}9294.10^{-2}$m " + 5.10^{-3}m $ZnSO_4$
[HCl] = 10^{-2}m; [KCl] = 0,1 m; V = 10,00 ml; t = 25°C

d) Glucosaminsäure

Glucosaminsäure-Zinkkomplexe wurden schon von Schaeg[43] untersucht. Sie verhalten sich wie die Zinkkomplexe von neutralen Aminosäuren: zerfallen sowohl bei einem (1:1) wie auch (2:1) Verhältnis im schwach alkalischen Bereich. In einer äquimolaren Lösung von Glucosaminsäure und Zinksulfat fällt bei pH = 7,25 Zinkhydroxyd aus; bei einem L:M-Verhältnis von (2:1) bei pH = 9. Die Ursache ist in der Struktur der Glucosaminsäure zu suchen, die dem „Serin-Typ" angehört (s.S.56).

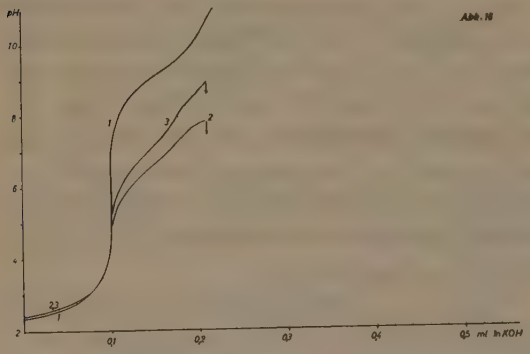


Abb.18

Potentiometrische Titration von Glucosaminsäure in Gegenwart und Abwesenheit von Zinksulfat.

1 = 10^{-2}m Glucosaminsäure
2 = 10^{-2}m " + 10^{-2}m $ZnSO_4$
3 = 10^{-2}m " + 5.10^{-3}m $ZnSO_4$
[HCl] = 10^{-2}m; [KCl] = 0,1 m; V = 10,00 ml; t = 25°C

3. Nickelkomplexe

Nickel(II)ionen besitzen die Koordinationszahl 6. Dieser Unterschied macht sich, in dem gegenüber Kupferchelaten veränderten Verhalten, bemerkbar.

a) Fructose-Glycin

Aus dem Vergleich der Titrationskurven mit und ohne Nickelchlorid (Abb.19) und aus den spektrophotometrischen Daten (Abb.20) ist zu ersehen, dass in einer äquimolaren Lösung von Ligand und Metall unterhalb pH = 4 keine Komplexbildung statt-

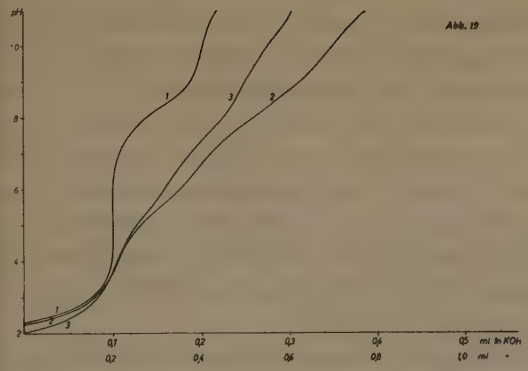


Abb.19

Potentiometrische Titration von Fructose-Glycin in Gegenwart und Abwesenheit von Nickel(II)chlorid.

1 = 10^{-2}m Fructose-Glycin

2 = 10^{-2}m " + 0,9624.10^{-2}m $NiCl_2$

3 = 2.10^{-2}m " + 0,9624.10^{-2}m $NiCl_2$ (untere x) Skala)

[HCl] = 10^{-2}m; [KVl] = 0,1 m; V = 10,00 ml; t = 25°C

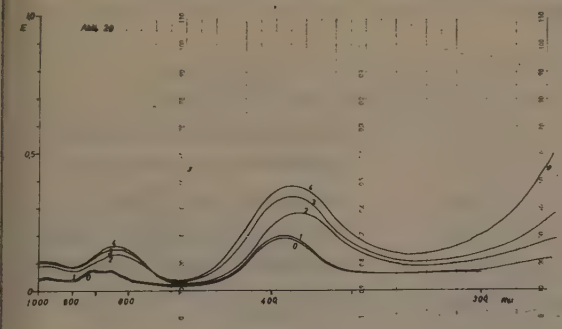


Abb.20

Absorptionskurven von Fructose-Glycin in Gegenwart von Nickel(II)-chlorid (L:M=1:1) bei verschiedenen pH-Werten.

Ansatz:
6,36.10^{-3}m $NiCl_2$ +
6,6.10^{-3}m Fru-Gly
in 0,1 m KCl
V = 12,0 ml; l = 5 cm

0. $NiCl_2$ ohne Ligand 1. pH = 3,90 2. pH = 7,20
3. pH = 9,0 4. pH = 10,9

Im Bereich pH = 4-7 findet eine Koordinierung der Aminogruppe statt, was sich durch eine pH-Depression in der Titrationskurve und in einer Verschiebung des Absorptionsmaximums auf λ_2 = 625 mμ und λ_3 = 383 mμ bemerkbar macht. Die Kurven gehen durch einen isosbestischen Punkt bei 720 mμ und liegen im

x) [HCl] = 2.10^{-2}m

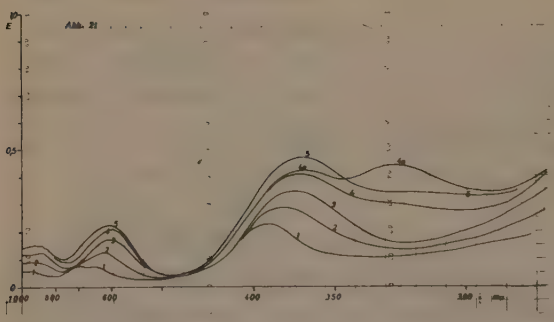
aufsteigenden Ast sehr nahe beieinander, woraus auf ein einfaches Gleichgewicht (analog den Formeln I ⟶ II, nur mit Ni als Zentralatom) geschlossen werden darf. Dieser Vorgang ist bei pH ca. 7 (und zwei Äquivalenten KOH) abgeschlossen.

Ähnlich wie bei den besprochenen Kupfer- und Zinkchelaten fällt auch hier bei weiterer KOH-Zugabe kein Nickelhydroxyd aus (welches man z.B. bei der Titration von äquimolaren Mengen Glycin und Nickelchlorid bei pH ca. 8,6 unter den gleichen Bedingen bemerkt). Daraus wird wieder auf die Beteiligung einer Hydroxylgruppe des Liganden an der Chelatbildung geschlossen (Vorgang analog zu II ⟶ VI, VII, S.24).

Auch bei längerem Stehen der Lösung und sogar bei kurzem Kochen über dem Bunsenbrenner fällt kein Niederschlag von Nickelhydroxyd aus - was von der Stabilität der Nickelchelate zeugt.

Die spektrophotometrische Untersuchung des (2:1)-Ansatzes (Abb.21) zeigt auf den ersten Blick, dass sich die Absorptionsspektren bei Ligandüberschuss deutlich von denen bei äquimolaren Mengen unterscheiden.

Abb.21



Absorptionskurven von Fructose-Glycin in Gegenwart von Nickel(II)-chlorid (L:M=2:1) bei verschiedenen pH-Werten.

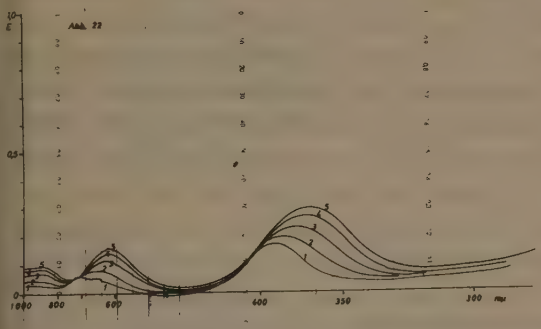
Ansatz:
$6{,}36.10^{-3}$m $NiCl_2$ +
$1{,}32.10^{-2}$m Fru-Gly
in 0,1 m KCl
V = 12,0 ml; l = 5 cm

1. pH = 3,95 2. pH = 6,00 3. pH = 7,20
4. pH = 8,00 4a. 25 Min. nach 4. 5. pH = 10,0

Das (2:1)-Spektrum weist eine grosse Ähnlichkeit mit dem Absorptionsspektrum einer Glycin-Nickel-chloridlösung

(im Verhältnis 2:1) auf (Abb.22): das Absorptionsmaximum erreicht in beiden Fällen den gleichen Wert von 368 mμ. Daraus darf auf die Bildung eines 2:1 Komplexes geschlossen werden (analog zu Formel X auf S.35).

Abb.22

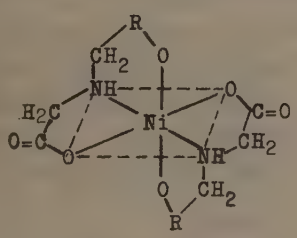


Absorptionskurven von Glycin in Gegenwart von Nickel(II)chlorid (L:M=2:1) bei verschiedenen pH-Werten.

Ansatz:
$6{,}36.10^{-3}$m $NiCl_2$ +
$1{,}32.10^{-2}$m Glycin.HCl
in 0,1 m KCl
V = 12,0 ml; l = 5 cm

1. pH = 4,45 2. pH = 6,00 3. pH = 7,20 4. pH = 8,0
5. pH = 9,20 Bei pH = 9,5 fällt Nickelhydroxyd aus!

Aus der Tatsache, dass bei weiterer KOH-Zugabe kein Nickelhydroxyd ausfällt (wie das bei Glycin z.B. der Fall ist: Abb.22) und dass die Titrationskurve vor Erreichen des vierten Äquivalents KOH nicht ansteigt, sondern dass weiter KOH verbraucht wird, kann auf eine Beteiligung der Hydroxylgruppen des Ligandmoleküls geschlossen werden. Dieses andersartige (als bei Kupferchelaten) Verhalten ist auf die grössere Koordinationszahl der Nickel(II)ionen zurückzuführen: betrachtet man die entstandenen Nickelchelate als reguläre Oktaeder, dann kann man sich vorstellen, dass die Carboxylgruppen und die Aminogruppe planar angeordnet sind; in den Spitzen des Oktaeders befinden sich die zusätzlich gebundenen Hydroxylgruppen, wie das Formel XIII zum Ausdruck bringt.



XIII

Diese Formel erklärt die grosse Stabilität im alkalischen Bereich.

b) Fructose-Asparaginsäure

Die Ergebnisse der potentiometrischen und spektrophotometrischen Untersuchung geben die Abb. 23, 24 und 25 wieder.

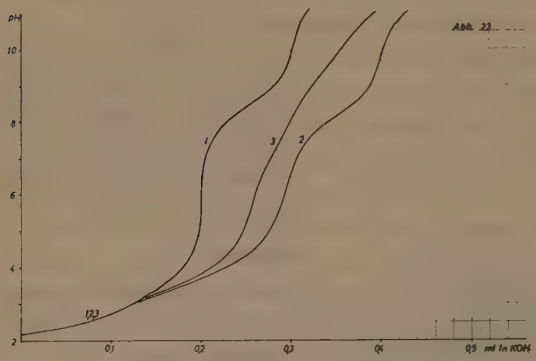


Abb. 23

Potentiometrische Titration von Fructose-Asparaginsäure in Gegenwart und Abwesenheit von Nickel(II)chlorid.

1 = 10^{-2}m Fructose-Asparaginsäure
2 = 10^{-2}m " + 0,9624.10^{-2}m $NiCl_2$
3 = 10^{-2}m " + 0,4812.10^{-2}m $NiCl_2$
[HCl] = 10^{-2}m; [KCl] = 0,1 m; V = 10,00 ml; t = 25°C

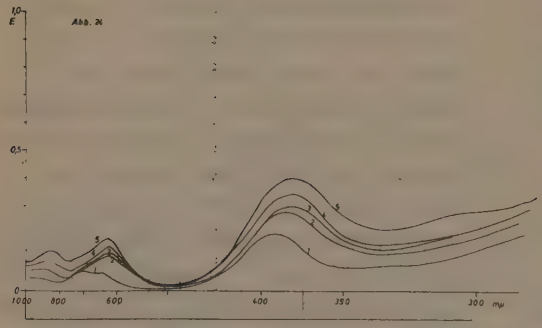


Abb. 24

Absorptionskurven von Fructose-Asparaginsäure in Gegenwart von Nickel(II)chlorid (L:M = 1:1) bei verschiedenen pH-Werten.

Ansatz:
6,36.10^{-3}m $NiCl_2$ +
6,6.10^{-3}m Fru-Asp. in 0,1 m KCl

V = 12,0 ml; l = 5 cm

1. pH = 2,80 2. pH = 5,01 3. pH = 7,22
4. pH = 8,04 5. pH = 10,05

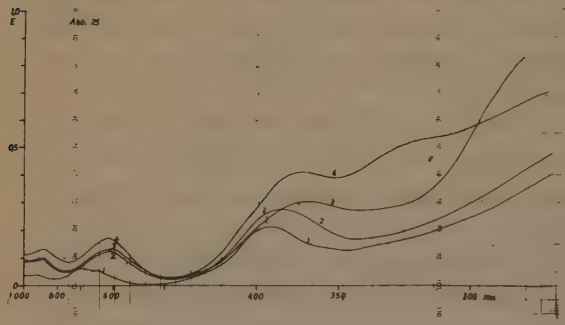
Die Komplexbildung beginnt erst, nachdem eine Carboxylgruppe vollkommen entprotonisiert wurde und ist vor Erreichen des zweiten Äquivalents Lauge deutlich feststellbar. Darauf folgt, anders als bei Fructose-Glycin-Nickel, ohne „inflection point" die Protonenabspaltung von der Ammoniumgruppe, die bei der Fructose-Asparaginsäure bei einem wesentlich niedrigeren pH erfolgt, als bei Fructose-Glycin. Das ist eine bemerkenswerte Tatsache, weil die basischen Dissoziationskonstanten von Fructose-Glycin und Fructose-Asparaginsäure (s. S.19) fast identisch sind. Man kann diesen Effekt nur durch die Annahme deuten, dass bei der Fructose-Asparaginsäure beide Carboxylgruppen an der Chelatbildung beteiligt sind. Das steht in Einklang mit Kalottenmodellen und mit den Arbeiten von Chaberek und Martell[84], die Metallchelate der Asparaginsäure untersucht hatten. Die zweite Carboxylgruppe soll danach die Spitze des Oktaeders des Nickelchelates besetzen. Das so entstandene Chelat ermöglicht durch den Chelateffekt eine Deprotonisierung bei niedrigerem pH.

Nun folgt ein Knick in der Titrationskurve (Abb.23, Kurve 2) und danach die Protonenabspaltung von der Hydroxylgruppe des Liganden. Die Titrationskurve von Fructose-Asparaginsäure-Nickel liegt höher als die von Fructose-Glycin-Nickel, was durch die höhere Basizitätskonstante von Fructose-Asparaginsäure (s. S.19, $\log K'_{III}$) verursacht wird. Beim vierten Äquivalent KOH ist die Deprotonisierung abgeschlossen - anders als beim Fructose-Glycin, bei dem die Titrationskurve noch langsam ansteigt. Dieser Umstand ist wohl dadurch bedingt, dass beim Fructose-Asparaginsäure-Nickelchelat vier Koordinationsstellen besetzt sind, bei Fructose-Glycin-Nickel (s. S.41) im gleichen Zustand nur drei. Die gegebenen Erklärungen werden noch durch das Spektrum (Abb.24) gestützt.

Bei einem Ligand : Metallverhältnis von 2:1 verhält sich Fructose-Asparaginsäure (Abb.23, Kurve 3) anders als Fructose-Glycin (Abb.19, Kurve 3): bei Fructose-Glycin kommt nach Neutralisation der Carboxylgruppe ein „inflection point", danach steigt die Kurve gleichmässig an. Daraus wurde auf die Ausbildung eines 2:1-Komplexes geschlossen. Bei der Fructose-Asparaginsäure dagegen tritt der „inflection point" genau nach der Neutralisation der Hälfte der vorhandenen Aminogruppen auf.

Das deutet auf eine starke Bevorzugung des 1:1-Chelates hin. Danach erfolgt die Deprotonisierung der zweiten Hälfte der Aminogruppen unter Ausbildung eines 2:1-Komplexes (analog zu Formel XIII,S.44). Dieser Vorgang wird wahrscheinlich noch von zwei anderen überlagert: von der Dissoziation des freien Liganden und der Deprotonisierung der (1:1)- und (2:1)-Komplexe. Im physiologischen pH-Bereich liegt danach ein Gleichgewicht des (1:1)- und (2:1)-Komplexes vor. Bei pH = 7,20 ist noch keine Alkoxo-(Hydroxo-)komplexbildung zu sehen. Diese ist aber bei pH = 8,1 schon deutlich: man erkennt sie an der Zunahme der Extinktion ausserhalb des Maximums (Abb.25).

Abb.25



Absorptionskurven von Fructose-Asparaginsäure in Gegenwart von Nickel(II)chlorid (L:M = 2:1) bei verschiedenen pH-Werten.

Ansatz:
$6{,}36.10^{-3}$m $NiCl_2$ + $1{,}32.10^{-2}$m Fru-Asp in 0,1 m KCl

V = 12,0 ml; l = 5 cm

1. pH = 2,67 2. pH = 4,00 3. pH = 8,10 4. pH = 9,90

Die entsprechende Verschiebung des Maximums zu längeren Wellen hin darf vielleicht als Re-Umlagerung des (2:1-) in dem 1:1-Komplex gedeutet werden.

Die geschilderten Vorgänge haben eine gewisse Analogie bei den Kupferkomplexen des Fructose-Glycins: dort konnte die Ausbildung eines stabilen 1:1-Chelates (S.23, Formel IV) schon durch den dreizähnigen Liganden Fructose-Glycin erreicht werden, da Kupferionen die Koordinationszahl vier besitzen. Hier muss zur Ausbildung eines stabilen 1:1-Chelates der vierzähnige Ligand Fructose-Asparaginsäure herangeholt werden. Es scheint, dass stabile 1:1-Chelate immer dann gebildet werden, wenn der Ligand in der Lage ist mehr als die Hälfte der Koordinations-

stellen des Metallions abzusättigen, bei Kupfer(II)ionen also mindestens 3 Koordinationsstellen, bei Nickel(II)ionen mindestens 4 Koordinationsstellen zu besetzen.

c) Glucose-Glycin

Das Glucose-Glycin verhält sich ähnlich wie das Fructose-Glycin. Es bildet stabile 1:1-Komplexe, wie das aus der Titrationskurve (Abb.26) und dem Spektrogramm (Abb.27) zu ersehen ist.

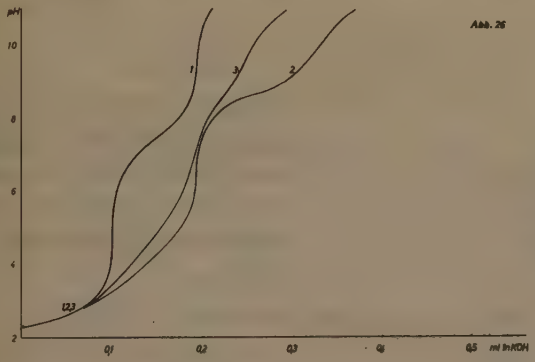


Abb.26

Potentiometrische Titration von Glucose-Glycin in Gegenwart und Abwesenheit von Nickel(II)chlorid.

1 = $0{,}9294.10^{-2}$m Glucose-Glycin

2 = $0{,}9294.10^{-2}$m " + $0{,}9624.10^{-2}$m $NiCl_2$

3 = $0{,}9294.10^{-2}$m " + $0{,}4812.10^{-2}$m $NiCl_2$

[HCl] = 10^{-2}m; [KCl] = 0,1 m; V = 10,00 ml; t = 25°C

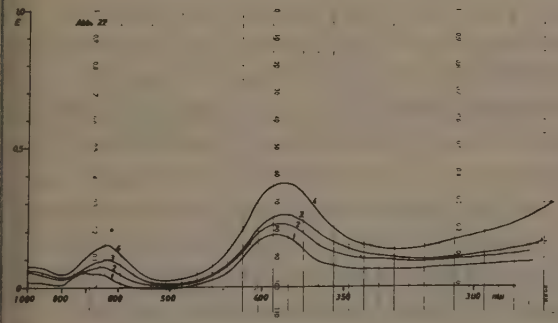


Abb.27

Absorptionskurven von Glucose-Glycin in Gegenwart von Nickel(II)chlorid (L:M = 1:1) bei verschiedenen pH-Werten.

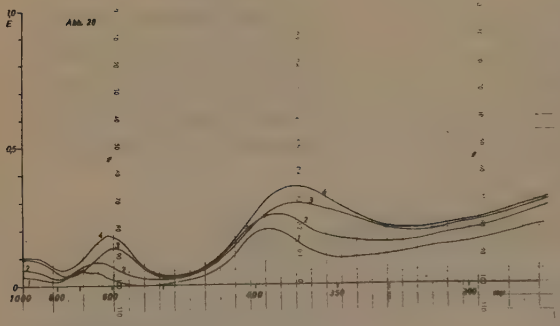
Ansatz:
$6{,}36.10^{-3}$m $NiCl_2$ +
$6{,}14.10^{-3}$m Gluc—Gly.HCl
in 0,1 m KCl
V = 12,0 ml; l = 5 cm

1. pH = 2,40 2. pH = 3,90 3. pH = 6,35
4. pH = 10,08 Messung bei pH = 8,03 fast identisch mit Kurve 3.

Da die Basizitätskonstante der freien Aminogruppe niedriger ist als bei Fructose-Glycin (s.S.19) und die Komplexbildung bei einem tieferen pH beginnt, ist in der Titrationskurve eine deutliche Stufe sichtbar. Die Absorptionsmaxima sind die gleichen wie beim Fructose-Glycin-Nickelkomplex.

Bei Ligandüberschuss ist aus Abb.26 Kurve 3 und Abb.28 zu ersehen, dass sich Glucose-Glycin in Gegenwart von Nickelionen auch analog zu Fructose-Glycin (s.S.41) verhält, d.h. es bildet 2:1-Komplexe.

Abb.28



Absorptionskurven von Glucose-Glycin in Gegenwart von Nickel(II)chlorid (L:M = 2:1) bei verschiedenen pH-Werten.

Ansatz:
$6{,}36.10^{-3}$m $NiCl_2$ +
$1{,}28.10^{-2}$m Gluc-Gly.HCl
in 0,1 m KCl
V = 12,0 ml; l = 5 cm

1. pH = 2,15 2. pH = 3,95 3. pH = 6,30 4. pH = 9,98

d) Glucosaminsäure

Bei der potentiometrischen Titration von Glucosaminsäure-Nickelchloridlösung (1:1) fällt im Gegensatz zu den früheren Titrationen von Glucosaminsäure mit Zink- oder Kupferionen kein Metallhydroxyd aus. Titriert man dagegen Glycin in Gegenwart einer äquimolaren Menge Nickelionen, dann fällt bei einem geringen KOH-Überschuss bei pH = 8,7 ein deutlich wahrnehmbarer Niederschlag von Nickelhydroxyd aus. Aus diesem Befund muss geschlossen werden, dass die Hydroxylgruppen des Glucosaminsäure-Moleküls diese Fällung verhindern, weil sie an das Nickelion gebunden sind. Die Ergebnisse sind in den Abb. 29 und 30 wiedergegeben. Glucosaminsäure bildet also in Gegenwart einer äquimolaren Menge Nickelionen einen gegen Hydrolyse beständigen (1:1)-Komplex.

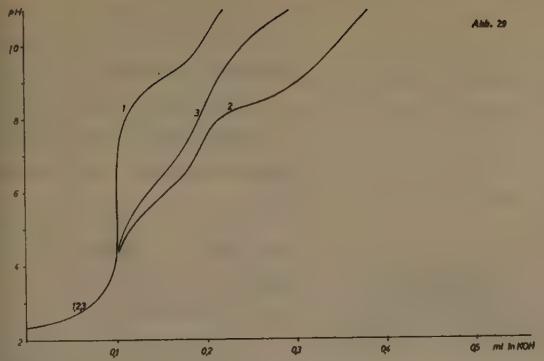


Abb.29

Potentiometrische Titration von Glucosaminsäure in Gegenwart und Abwesenheit von Nickel(II)chlorid.

1 = 10^{-2}m Glucosaminsäure

2 = 10^{-2}m " + $0{,}9624.10^{-2}$m $NiCl_2$

3 = 10^{-2}m " + $0{,}4812.10^{-2}$m $NiCl_2$

[HCl] = 10^{-2}m; [KCl] = 0,1 m; V = 10,00 ml; t = 25°C

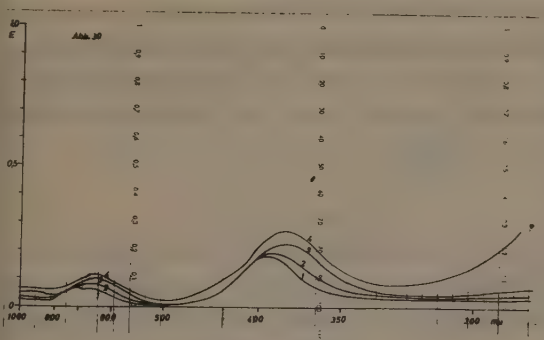


Abb.30

Absorptionskurven von Glucosaminsäure in Gegenwart von Nickel(II)-chlorid (L:M = 1:1) bei verschiedenen pH-Werten.

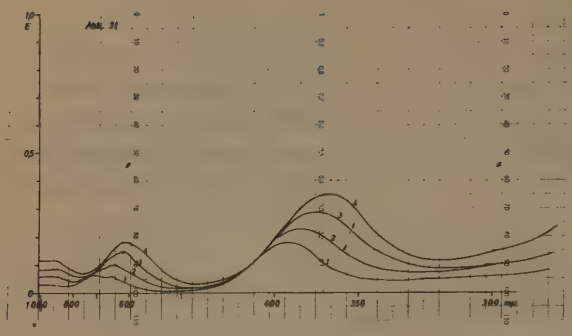
Ansatz:
$6{,}36.10^{-3}$m $NiCl_2$ +
$6{,}66.10^{-3}$m GAS.HCl
in 0,1 m KCl

V = 12,0 ml; l = 5 cm

1. pH = 2,48 2. pH = 5,95 3. pH = 7,27 4. pH = 10,0

Die Messungen bei einem (2:1)-Verhältnis geben die Abb. 29, Kurve 3 und Abb.31 wieder. Wie bei Fructose-Glycin und Glucose-Glycin ist hier die Ausbildung eines 2:1-Komplexes ersichtlich.

Abb.31



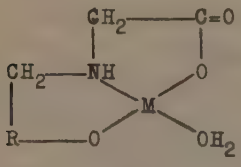
Absorptionskurven von Glucosaminsäure in Gegenwart von Nickel(II)-chlorid (L:M = 2:1) bei verschiedenen pH-Werten.

Ansatz:
$6{,}36.10^{-3}$m $NiCl_2$ +
$1{,}32.10^{-2}$m GAS.HCl
in 0,1 m KCl
V = 12,0 ml; l = 5 cm

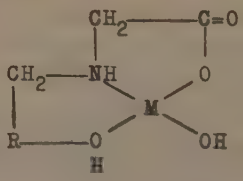
1. pH = 2,20 2. pH = 6,0 3. pH = 7,20 4. pH = 9,95
Messung bei pH = 4,45 fast identisch mit Kurve 1 und bei pH = 8,48 mit Kurve 4, nur Extinktion um ca. 5 % höher.

C. Stabilitätskonstanten

Aus der ausführlichen Diskussion der potentiometrischen und spektrophotometrischen Messungen geht hervor, dass die Metallchelate der untersuchten Liganden in zwei verschiedenen Formen vorliegen können, entweder als Alkoxo- oder als Hydroxokomplexe:



Alkoxochelat



Hydroxochelat

Der Unterschied zwischen diesen Formen besteht darin, dass einmal das im Verlaufe der Titration abgespaltene Proton von der Hydroxylgruppe des Liganden, das zweite Mal vom assoziierten Wassermolekül stammt.

Betrachtet man das Metallchelat als Alkoxokomplex, dann ist man berechtigt die Stabilitätskonstante nach den folgenden Formeln zu berechnen:
für die erste Stufe der Komplexbildung zwischen Metallion und Ligand kann man die Stabilitätskonstante wie bei den Aminosäurechelaten definieren:

$$LH^- + M^{++} \rightleftharpoons LMH^+$$

und daraus:

$$K_1 = \frac{[LMH^+]}{[LH^-]\cdot[M^{++}]}$$

wobei durch:

LH^- - der Ligand mit negativer(n) Carboxylgruppe(n) und neutraler Aminogruppe bezeichnet wird,

LMH^+ - das aus diesem, teilweise entprotonisiertem Liganden resultierende Metallchelat (als Hydrogenkomplex formuliert).

Dieses Metallchelat kann in einem hlheren pH-Bereich Protonen abgeben gemäss der Gleichung:

$$LMH^+ \rightleftharpoons LM + H^+ \quad .$$

Aus diesem Gleichgewicht kann die Stabilitätskonstante definiert werden als:

$$K_2 = \frac{[LM]}{[LMH^+]}$$

Aus diesen beiden Konstanten und der dritten Basizitätskonstante sowie der Wasserstoffionenkonzentration kann die pH-unabhängige „over-all" Konstante K berechnet werden:

$$K = K_1 \cdot K_2 \cdot K'_{III} \cdot [H^+] \quad .$$

Betrachtet man das Chelat als Hydroxokomplex, dann ändert sich nichts an der Berechnung und Gültigkeit von K_1. Dagegen kann man K_2 nicht nach der obigen Gleichung berechnen, weil das

Proton vom assoziierten Wassermolekül stammt. In solchen Fällen ist es üblich[63] die Assoziationskonstante der Hydroxylgruppe (oder deren Kehrwert) zu berechnen:

$$LMH(H_2O)^+ \rightleftharpoons LM(OH) + H^+$$

$$K_3 = \frac{[LMH(H_2O)^+]}{[LMH(OH)] \cdot [H^+]}$$

Diese Konstante ist formal mit einer Basizitätskonstante zu vergleichen, wenn man das Metallchelat als Säure betrachtet, die ein Proton abgibt (oder umgekehrt das Hydroxochelat als Base). Dann ist der log K_3-Wert gleich dem pH-Wert, bei dem die Hälfte aller Chelatmoleküle ein Hydroxylion aufgenommen hat. In dem hier in Frage kommenden Bereich zwischen pH = 7 bis pH = 10 kann man die log K_3-Werte einfach der Titrationskurve entnehmen.

In der folgenden Tabelle 3 sind die Stabilitätskonstanten der einzelnen Metallchelate angegeben.

Der in Tabelle 3 wiedergegebene Wert log K_4 wurde aus den Titrationskurven direkt entnommen. Er ist analog zu log K_3 definiert für jedes weitere Äquivalent an verbrauchter Kalilauge. Er entspricht dem auf Seite 25 definierten Vorgang: VI, VII ⟶ VIII.

Tabelle 3

Stabilitätskonstanten der untersuchten Metallkomplexe

Alle Titrationen bei 25,0° ± 0,5°C in 0,1 m KCl

Kupferchelate

Ligand	log K_1	log K	log K_3	log K_4
Fructose-Glycin	7,28 ± 0,01	14,22 ± 0,10	5,50	8,60
Fructose-Asparagins.	10,14 ± 0,04	17,38 ± 0,02	5,50	Nd.
Glucose-Glycin	7,33 ± 0,03	13,76 ± 0,08	6,15	9,80
Glucosaminsäure	8,09 ± 0,04	-	Nd.	Nd.

Nickelchelate

Fructose-Glycin	5,01 ± 0,10	9,58 ± 0,03	7,85	10,01
Fructose-Asparagins.	6,57 ± 0,03	11,15 ± 0,02	8,15	11
Glucose-Glycin	5,56 ± 0,10	9,58 ± 0,09	8,40	10,30
Glucosaminsäure	5,54 ± 0,10	-	8,40	10,25

Zinkchelate

Fructose-Glycin	4,10 ± 0,10	9,53 ± 0,18	7,25	9,10
Fructose-Asparagins.	5,40 ± 0,05	10,35 ± 0,17	7,80	9,90
Glucose-Glycin	4,63 ± 0,07	-	7,80	Nd.
Glucosaminsäure	4,25 ± 0,02	-	Nd.	Nd.

Nd. = Niederschlag

D. Diskussion der Stabilitätskonstanten

Während der potentiometrischen Untersuchung der Amadori- und Heyns-Verbindungen fiel gleich am Anfang ihr, im Verhältnis zu Aminosäuren, verändertes Verhalten auf (welches im Kapitel über die qualitativen Eigenschaften der Chelate diskutiert wurde S.21), vor allem ihre Beständigkeit im alkalischen Bereich. Bei der Titration von Aminosäuren in Gegenwart von Metallionen im Verhältnis 1:1 fallen immer Niederschläge der entsprechenden Metallhydroxyde aus, auch wenn die Stabilitätskonstanten der Metallchelate sehr hoch sind wie z.B. beim Histidin-Kupfer (log K_1 = 10,37 nach Lebermann und Rabin[89]). Dagegen sind (1:1) Metallchelate von Amadori- und Heyns-Verbindungen (teilweise auch der Glucosaminsäure) im Alkalischen gegen Metallhydroxydbildung beständig. Diese Beständigkeit erstreckt sich auf Zeiträume von Wochen und Monaten: wurden die titrierten Lösungen, deren pH zwischen 10 und 12 lag bei Zimmertemperatur im verschlossenen Reagensglas aufbewahrt, trat keine sichtbare Trübung der klaren Lösungen ein - ausser in den Fällen, in denen eine Reduktion der Metallionen stattfindet (z.B. bei Cu^{++}, Hg^{++}). Erst nach dem Erhitzen dieser Lösungen im Bunsenbrenner tritt nach ca. 3 Minuten eine Gelb- bis Braunfärbung auf (was auf Veränderungen der Kohlehydratkomponente hinweist) und danach eine Metallhydroxydfällung. Dieser Unterschied zwischen Aminosäuren und den untersuchten Liganden muss auf die Anwesenheit von Hydroxylgruppen in den letzteren zurückzuführen sein. In diesem Kapitel kommt sie in den erhöhten Stabilitätskonstanten zum Ausdruck.

Vergleicht man die ermittelten Stabilitätskonstanten mit denen des Glycins[63] und der Asparaginsäure (Tab.4), dann bemerkt man, dass, ausser bei Fructose-Asparagins., deren Stabilitätskonstante wesentlich höher liegt als von Asp-Cu (1:1), die Stabilitätskonstanten der übrigen Aminosäuren nur unwesentlich höher liegen als die der untersuchten Liganden. Erwartungsgemäss sollten sie aber wesentlich höher liegen, weil die Basizitätskonstanten der Aminosäuren grösser sind als der Zucker-Aminosäuren. Diese Tatsache deutet auf eine Beteiligung der Hydroxyl-

gruppen hin, was schon Chaberek et al.[82] für die N,N-Dihydroxyglycinchelate postuliert hatten.

Tabelle 4

Stabilitätskonstanten von Aminosäure-Metallkomplexen (Literaturwerte)

Ligand	Basizitätskonstante	log K_1 Cu^{++}	Ni^{++}	Zn^{++}	Literatur	Bedingung
Glycin	9,78	8,12	5,73	4,34	63	20°; 0,1 m KCl
Asparaginsäure	9,62	8,57	7,12	5,84	63	30°; 0,1 m "
N,N-Dihydroxyäthyl-Glycin (HxG)	8,08	8,15	6,38	5,36	63	30°; 0,1 m KCl
Iminodiessigsäure (IDE)	9,12	10,55	8,26	7,03	63	30°; 0,1 m "
N-Hydroxyäthyl-Glycin (HG)	9,98	-	-	4,89	43	25°; 0,1 m "
D,L-Serin	9,10	-	5,48[90]	4,65	43	25°; 0,1 m "
Hydroxyprolin	9,47	8,33	-	-	91	

Die in Tab.4 aufgezählten Verbindungen gehören entweder dem

„Serin-Typ" (wie Gly, OH-Pro, Asp)

oder dem

„Iminodiessigsäure-Typ" (wie HxG, HG, IDE) an.

Die Stabilitätskonstanten der Kupferchelate dieser beiden Typen unterscheiden sich deutlich voneinander:

Serin-Typ: $\log K_1 = 8 - 8{,}5$

Iminodiessigsäuretyp: $\log K_1 \cong 10{,}5$

HxG scheint hier eine Ausnahme zu machen, denn es besitzt eine Stabilitätskonstante $\log K_1 = 8{,}15$. Dieses Phänomen beruht aber darauf, dass bei der Berechnung der Stabilitätskonstante[82] nur die Koordination der Amino- und Carboxylgruppe, nicht aber die der Hydroxylgruppe berücksichtigt wurde, d.h. HxG wurde als zum Serin-Typ zugehörig, behandelt. Dabei zeigt die Titrationskurve, dass zusätzlich Protonen frei werden[82)81)], welche nach

Angaben der Autoren entweder von den Hydroxylgruppen des Liganden oder vom assoziierten Wasser stammen. Die Stabilitätskonstante dieser Verbindung wird aber nur für den letzteren Fall berechnet.

Diese Inkonsequenz findet man auch in anderen Arbeiten, in denen eine Assoziation von Hydroxylgruppen stattfindet, z.B. in einer grossen Arbeit von Martell et al.[92] wird nur die Assoziationskonstante der Hydroxylgruppe des Lösungsmittels angegeben, obwohl mit aller Deutlichkeit festgestellt wird, dass die koordinierte Hydroxylgruppe vom Lingandmolekül stammt. Die Ursache ist in der sehr hohen Basizitätskonstante dieser Hydroxylgruppe zu suchen, die durch eine potentiometrische Titration nicht erfasst werden kann.

Es sei noch erwähnt, dass sogar im Falle der Citronensäure- und der Weinsäure-Kupferchelate keine genauen Stabilitätskonstanten in der Literatur angegeben werden, obwohl diese Verbindungen zu den ältesten bekannten Kupferchelaten gehören! So geben Chaberek und Martell[81] für den log K_1-Wert des Kupfercitrats log K_1 = 6,4 an, in „Stability Constants"[63] findet man den Wert log K_1=18. Der zweite Wert wurde von Warner und Weber[93] unter der vollkommen willkürlichen Annahme berechnet, dass die Basizitätskonstante der Hydroxylgruppe der Citronensäure log K = 16 ist! Im Falle der Citronensäure-Kupferchelate werden bei einer potentiometrischen Titration vier Protonen vor Erreichen des Neutralpunktes abgegeben. Das vierte Proton stammt aller Wahrscheinlichkeit nach von der Hydroxylgruppe des Liganden.

Auch bei der Untersuchung der Kupferchelate der Gluconsäure fanden Pecsok und Juvet[94], dass die Gluconsäure z w e i Protonen abgibt: eins von der Carboxyl- und das andere von einer Hydroxygruppe. Sie bestimmten die Stabilitätskonstante des (1:1)-Kupfergluconatchelates mit einer polarographischen Methode zu log K_1=18, (25^oC; 0,1 m KCl).

Diese Fälle zeigen, wie stabil Kupferchelate sind, an deren Bildung Hydroxylgruppen des Liganden beteiligt sind, wenn diese Hydroxylgruppen ihr Proton abgegeben haben.

Im Lichte dieser Tatsachen erscheint es voll gerechtfertigt anzunehmen, dass die Amadori- und Heynsverbindungen vorwiegend

Alkoxokomplexe bilden. Dies ist umso wahrscheinlicher, da bei der Titration der freien Liganden ein Wasserstoffatom gefunden wurde, welches saurer ist als alle anderen, und saurer als die Wasserstoffatome der Hydroxylgruppen der Glucosaminsäure. Dabei darf nicht vergessen werden, dass sterische Verhältnisse a priori für die Abspaltung dieses Protons bei niedrigerem pH im Falle der Metallchelate, verantwotlich zu machen sind. Vor einer Abspaltung des Protons findet wahrscheinlich eine Koordination des Metallions statt.

Die auf Grund dieser Annahmen berechneten Stabilitätskonstanten sind im Verhältnis zu denen der Aminosäuren sehr hoch. Sie lassen sich aber gut mit dreizähnigen Aminosäuren vom Typ der Iminodiessigsäure vergleichen (Tab.5) und sie reichen im Falle der Fructose-Asparaginsäure sogar an die Stabilitätskonstante der Äthylendiamintetraessigsäure (ÄDTA) heran.

Tabelle 5

Stabilitätskonstanten von Aminosäure-Metallkomplexen (nach „Stability Constants" [63])

Ligand	Basizitäts-konstante	log K_1			Bedingungen
	log K'	Cu^{++}	Ni^{++}	Zn^{++}	
Iminodiessig-säure	9,12	10,55	8,26	7,03	30°C; 0,1 m KCl
Nitrilotrie-essigsäure	9,73	12,68	11,26	10,45	20°C; 0,1 m KCl
N-Hydroxyäthyl-iminodiessigsäure	8,73	11,86	9,28	8,33	20°C; 0,1 m KCl
ÄDTA	10,26	18,79	18,56	16,26	20°C; 0,1 m KCl

Die so berechneten Konstanten erklären auch die grosse Alkalibeständigkeit der untersuchten Metallchelate, die sich so gänzlich anders verhalten, als die der zugehörigen Aminosäuren Glycin und Asparaginsäure.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Amadori- und Heyns-Verbindungen einer neuen Klasse von Chelatbildnern mit vortrefflichen chelierenden Eigenschaften angehören.

VIII. Calciumkomplexe

Die Frage nach dem Calciumbindungsvermögen konnte mit Hilfe der potentiometrischen Titration nicht gelöst werden, weil die Titrationskurven von Amadori- und Heynsverbindungen in Gegenwart von Calciumionen sich von denen der freien Liganden kaum unterscheiden, wie durch Vorversuche festgestellt wurde.

Als Alternative bot sich die Bestimmung der freien Calciumionen mit einer spektrophotometrischen Methode an. Eine solche Methode würde auch die Bestimmung des Calciumbindungsvermögens von Liganden gestatten, die im physiologischen pH-Bereich über keine abspaltbaren Wasserstoffatome verfügen, wie z.B. die Monosaccharidsäuren, die Uronsäuren und die Mucopolysaccharide.

Schwarzenbach und Gysling fanden im Murexid einen Farbstoff, dessen Absorptionsmaximum von der Anwesenheit von Metallionen abhängt[95]. Sie wiesen auf die Möglichkeit hin, Murexid als Indikator auf Calciumionen zu verwenden. Raaflaub[96)97] wandte Murexid für die photometrische Bestimmung der Calciumionenkonzentration im Liquor cerebrospinalis an. Später verbesserten Ettori und Scogan[98] die Raaflaubsche Methode indem sie als neues Element die Messung bei zwei verschiedenen Wellenlängen einführten, um so, die durch die Unbeständigkeit des Murexids hervorgerufenen Fehler auf ein Minimum zu drücken (Raaflaub führte seine Messungen bei einer Wellenlänge, nämlich bei 470 mμ durch). Sie bestimmten die scheinbare Stabilitätskonstante des Calcium-Murexidkomplexes bei pH = 7,35 u.der Ionenstärke μ = 0,15. Aus Messungen der Extinktionen bei den Wellenlängen 480 und 520 mμ bildeten sie einen Quotienten φ und berechneten daraus und aus der bekannten Stabilitätskonstante für Calciummurexid die Konzentration an freien Calciumionen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Methode von Ettori und Scogan[98] angewandt. Dabei stellte es sich heraus, dass die Methode einige Nachteile aufweist: die Calciumkonzentrationen müssen jedesmal neu berechnet werden; bei Chelatbildnern mit geringem Calciumbindungsvermögen waren die Bestimmungen der freien Calciumkonzentration mit sehr grossen Fehlern behaftet, was darauf zurückzuführen ist, dass die Stabilitäts-

konstante bei einer viel höheren Calciumkonzentration bestimmt wurde als die bei den Messungen angewandte; ausserdem musste für jedes Ligand : Metallverhältnis ein neuer Ansatz der, oft kostbaren, Substanzen gemacht werden.

Deshalb wurde die Bestimmung der Calciumkonzentration verbessert:

(1) Sie erfolgt in einer 1 cm Küvette eines Spektralphotometers, in einem Volumen von 2,5 ml, wobei zu der Ligandlösung schrittweise eine konzentrierte Calciumchloridlösung zugegeben wird, so dass in einem Ansatz das Verhältnis Ligand : Metall variiert werden kann. Das führt zu einer grossen Zeit- und Materialersparnis.

(2) Die Bestimmung der freien Calciumionenkonzentration erfolgt an Hand einer Kurve, die die Abhängigkeit der Calciumionenkonzentration von dem Verhältnis der Extinktionen bei 480 mμ und 520 mμ angibt. Das gestattet die Erfassung auch kleiner Unterschiede in der Konzentration freier Calciumionen in Gegenwart und in Abwesenheit des Liganden (erlaubt die Bestimmung von Stabilitätskonstanten auch schwacher Calciumchelate). Durch die Verwendung einer Eichkurve werden auch die langwierigen Berechnungen eliminiert.

Die ausführliche Beschreibung der Methode und der durchgeführten Bestimmungen wird im Kapitel XI angegeben. Ausserdem wurde dieser Teil der Arbeit an die Redaktion von Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie gesandt, wo er demnächst unter dem Titel „Stabilitätskonstanten der Calciumkomplexe von sauren Mucopolysacchariden" von E.Buddecke und R.Drzeniek, erscheinen wird.[104)]

Aus der in Gegenwart des Liganden bestimmten Konzentration an freien Calciumionen wurde die Stabilitätskonstante wie folgt berechnet:

$$K_{CaL} = \frac{[CaL]}{[Ca^{++}]\cdot[L]}$$

Kennt man die Konzentration an freiem Calcium, dann wird die angeschriebene Formel umgewandelt in:

$$K_{CaL} = \frac{[Ca_t] - [Ca^{++}]}{[Ca^{++}]\cdot([L_t]-[Ca_t]+[Ca^{++}])}$$

wobei:

$[Ca_t]$ = die Konzentration an freiem und gebundenem Calcium (Calcium total)

$[Ca^{++}]$ = die Konzentration an freiem Calcium

[CaL] = die Konzentration an Calciumchelat

$[L_t]$ = die Gesamtkonzentration an Ligand

[L] = die Konzentration an nicht an Metall gebundenem Ligand

Alle Messungen wurden bei pH = 7,2 und bei einer Ionenstärke von 0,15 m KCl durchgeführt. Die berechnete Stabilitätskonstante für diese Bedingungen ist die von Weitzel et al.[99] eingeführte „Physiologische Bindungskonstante", eine für physiologische Betrachtungen besonders brauchbare Grösse. Über den Zusammenhang zwischen „Physiologischer Bindungskonstante" und der in „Stability Constants"[63] verwendeten „over all" Konstante wird im Kapitel XI eine Erläuterung gegeben.
Die Ergebnisse der Messungen sind in Tab.7 zusammengefasst.

Die Stabilitätskonstante von Calciumcitrat, die einen Standardwert darstellt, ist am besten mit der von Schubert und Lindenbaum[100] bestimmten zu vergleichen (log K = 3,15; pH = 7,2-7,3 und 0,16 m NaCl). Der hier gefundene niedrigere Wert ist darauf zurückzuführen, dass in dieser Arbeit die physiologische Bindungskonstante angegeben wird.

Auch die Stabilitätskonstante von Calciumgluconat stimmt mit den bisher ermittelten Werten gut überein (log K = 1,21 nach „Stability Constants"[63]). Dabei ist zu bemerken, dass die Gluconsäure auch bei einem grossen Überschuss im neutralen Bereich immer (1:1)-Chelate bildet, denn die bei verschiedenen Calciumkonzentrationen ermittelten Einzelwerte stimmen viel besser mit der Annahme eines (1:1)- als eines (2:1)-Chelates überein. Das Vorliegen des (1:1)-Chelates wird auch durch polarimetrische Messungen[101] für den Bereich pH = 2-11 und durch potentiometrische Messungen[102] sichergestellt. Da das Calciumion die Koordinationszahl sechs besitzt, ist mit einer Beteiligung von mehr als einer Hydroxylgruppe des Liganden an der Chelatbildung zu rechnen. Die wichtigste Rolle dürfte jedoch die Hydroxylgruppe in α-Stellung zur Carboxylgruppe spielen,

Tabelle 7

Stabilitätskonstanten der untersuchten Calciumkomplexe

Alle Messungen wurden bei pH = 7,2 (0,01 m Veronalpuffer) und in 0,1 m KCl durchgeführt.

Die totale Calciumkonzentration beträgt
$0{,}494 \cdot 10^{-3}$ bis $2{,}431 \cdot 10^{-3}$ m

	Endkonzentration Ligand: Mol/L·10^2	Stabilitätskonstante log K_{CaL}
Citronensäure	0,25	3,06 ± 0,05
Gluconsäure	80,0	1,15 ± 0,04
Glucuronsäure	100,0	0,72 ± 0,06
Galakturonsäure	80,0	0,70 ± 0,08
Fructose-Glycin	100,0	0,45 ± 0,08
Glucose-Glycin	100,0	0,79 ± 0,06
Heparin	0,5	2,18 ± 0,02
Heparin	1,0	2,09 ± 0,02
Chondroitinsulfat A	1,0	1,24 ± 0,06
Chondroitinsulfat B	1,0	1,39 ± 0,03
Rindernasenknorpel	1,0	1,14 ± 0,05
Hyaluronsäure	1,0	nicht messbar
Dextransulfat	1,0	1,34 ± 0,06
Polystyrolsulfat	1,0	~0,7

wie ein Vergleich mit den in Tabelle 8 angeführten Stabilitätskonstanten von α- und β-Hydroxysäuren zeigt.

Tabelle 8

Stabilitätskonstanten der Calciumkomplexe organischer Säuren (Literaturwerte)

Ligand	log K	Bedingungen	Literatur
Essigsäure	0,60	A	100
Propionsäure	0,50	B	102
Bernsteinsäure	1,00	A	100
Glycin	0	A	100
Alanin	0	A	100
Asparaginsäure	0,44	A	100
Milchsäure	1,08	B	102
Glycerinsäure	1,18	B	102
Glycolsäure	1,11	B	102
Gluconsäure	1,15	A	-
β-Hydroxybuttersäure	0,60	B	102
Serin	0,50	A	100
Hydroxyprolin	0,48	A	102
Glucuronsäure	0,72	A	-
Galakturonsäure	0,70	A	-

A-pH = 7,2; Ionenstärke = 0,15
B- „over-all" Konstante, μ = 0,20

An Hand dieser Tabelle wird verständlich, dass die Uronsäuren eine niedrigere Bindungskonstante aufweisen als die Gluconsäure: sie liegen in wässriger Lösung in der Pyranosidform vor und verhalten sich deshalb wie eine β-Hydroxysäure.

Die niedrigen Stabilitätskonstanten von Fructose-Glycin und Glucose-Glycin finden ihre Parallele in den Werten für

Serin und Hydroxyprolin. Daraus ist zu ersehen, dass eine Ammoniumgruppe an Stelle einer Hydroxylgruppe die Calciumaffinität (wahrscheinlich infolge der positiven Ladung) erheblich herabsetzt. Die höhere Bindungskonstante von Glucose-Glycin im Verhältnis zu Fructose - Glycin hängt mit der niedrigeren Basizitätskonstante der ersteren zusammen.

Die Bindungskonstanten der polymeren Substanzen wurden unter der Annahme berechnet, dass eine gegenseitige Beeinflussung der Disaccharideinheiten bei der Calciumbindung nicht stattfindet (siehe hierzu den Artikel von Klotz[103)104)]). Als „molare" Konzentration des Liganden wurde die Konzentration einer Disaccharideinheit in Gramm pro Liter gewählt. Diese Art der Konzentrationsangabe ermöglicht die Berechnung der Stabilitätskonstante von polymeren Substanzen, auch wenn das genaue Molekulargewicht nicht bekannt ist. Sie gestattet auch einen Vergleich zwischen niedermolekularen und makromolekularen Verbindungen.

Als stärkster Calciumbindner stellte sich das Heparin heraus. Viel schwächer dagegen binden die Chondroitinsulfate, wobei Chondroitinsulfat B stärker als Chondroitinsulfat A Calcium bindet, was eine Parallele im Cobaltbindungsvermögen[62)] und in der Basizitätskonstante[62)] hat. Die erstmalig unter physiologischen Bedingungen für die Chondroitinsulfate bestimmte Calcium-Bindungskonstante gibt eine plausible Erklärung für die Anreicherung von Calcium im Knorpel und für die beobachtete Parallelität zwischen Chondroitinsulfat- und Calciumgehalt (Näheres s. Buddecke und Drzeniek[104)]). Etwas überraschend ist die geringe Calciumaffinität der Hyaluronsäure und das relativ hohe Calciumbindungsvermögen des Dextransulfats, welches für eine starke Beteiligung der Sulfatgruppen am Calciumbindungsvermögen der Mucopolysaccharide spricht. Es sei nochmals auf die Arbeit[104)] verwiesen, in welcher die hier angeschnittenen Fragen ausführlicher diskutiert werden.

IX. Zur Struktur von Amadori-Verbindungen und ihrer Schwermetallkomplexe

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen über Schwermetallkomplexe vom Amadori—Verbindungen wurden zwei Beobachtungen gemacht, die es gerechtfertigt erscheinen, das Problem ihrer Struktur zu erörtern.

1) Bei Titrationen bis ins stark Alkalische (pH = 13) (s.S.19) wurde festgestellt, dass sich Fructose-Aminosäuren anders verhalten als z.B. Glycin oder auch Glucosaminsäure: sie geben im stark alkalischen Bereich zusätzlich Protonen ab. Auf diese Protonenabgabe wurde schon aus Titrationen in Gegenwart von Metallionen geschlossen, da in diesem Fall die Protonenabgabe bei einem niedrigeren pH stattfindet.

2) Sowohl bei Titrationen wie auch bei spektrophotometrischen Messungen wurde festgestellt, dass sich Fructose-Asparaginsäure anders verhält als (in gewissen Fällen) Fructose-Glycin. Fructose-Asparaginsäure hat die Fähigkeit Kupfer(II)ionen schon oberhalb pH = 5 zu Kupfer(I)ionen zu reduzieren, Fructose-Glycin (und Glucose-Glycin!) dagegen reduziert (als frische Lösung eingesetzt) erst bei einem viel höherem pH (pH ca. 11) und nach längerer Zeit.

Ad 1) Aus der potentiometrischen Titration kann nicht direkt entschieden werden (Abb.2, S.20), ob es sich um die Abgabe eines oder mehrerer Protonen handelt. Es ist jedoch anzunehmen, dass aus folgenden Gründen die Abgabe nur eines Protons stattfindet:

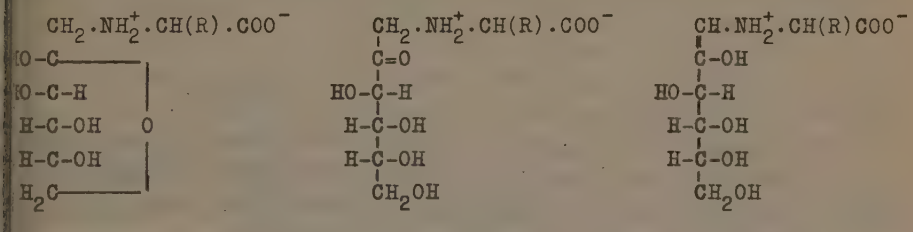
a) Vergleicht man die Titrationen von Glycin, Glucosaminsäure einerseits und die von Fructose-Glycin, Fructose-Asparaginsäure und Glucose-Glycin andererseits (Abb.2, S.20), dann stellt man fest, dass sich Glycin und Glucosaminsäure identisch verhalten. Daraus folgt, dass von den primären und sekundären Hydroxylgruppen der Glucosaminsäure bis pH = 13 keine nennenswerte Mengen n Protonen frei werden. Die Dissoziationskonstanten dieser Hydroxylgruppen müssen also oberhalb pH 13 liegen (Kuhn und Sobotka, zit. bei Perrin[105], nehmen einen pK-Wert von ca. 13 an).

Fructose-Glycin, Fructose-Asparaginsäure und Glucose-Glycin unterscheiden sich von der Glucosaminsäure durch die Anwesenheit einer Keto- bzw. Aldehydgruppe. Aller Wahrscheinlichkeit nach hängt die Abgabe der (im Verhältnis zu Glycin und Glucosaminsäure) zusätzlichen Protonen mit dieser Gruppe zusammen.

b) Die Auswertung der Titrationskurven bei verschiedenen pH-Werten führt, unter Annahme eines titrierbaren Wasserstoffs, zu gleichen Ergebnissen - was nur im Falle zweier Säurefunktionen mit gleicher Dissoziationskonstante möglich ist. So ein Fall tritt aber sehr selten ein, weil die Ausbildung eines Anions die Dissoziationskonstante der zweiten Gruppe stark beeinflusst.

c) Die Titrationskurven in Gegenwart von Metallionen weisen auch auf die Dissoziation eines zusätzlichen Protons hin. Dieser „saure" Wasserstoff könnte von der von verschiedenen Autoren[8) 21)86,S.244)106)107)] postulierten aber nicht sicher nachgewiesenen Enaminolgruppe herrühren.

Es besteht danach die Wahrscheinlichkeit, dass Amadori—Verbindungen in mindestens drei verschiedenen tautomeren Formen vorkommen: in der Ketoform (XIV), in der Halbacetalform (XV) und in der Enolform (XVI).



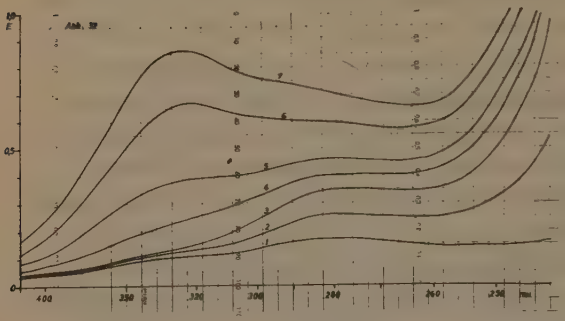
XV XIV XVI

In einer Arbeit über Difructose-Aminosäuren diskutiert Anet[27)] noch die Möglichkeit einer Enolform, bei der sich die Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen zwei und drei des Zuckeranteils befindet. Es wäre denkbar, dass so eine Enolform auch im Falle der Monofructose-Aminosäuren existiert.

An dieser Stelle sei noch erwähnt, dass bei der Titration bis ins stark Alkalische mit grosser Vorsicht und Schnelligkeit vorgegangen wurde: die Titration erfolgte unter reinstem Stickstoff und dauerte ca. 8 bis 20 Minuten (wobei die erhaltenen log K-Werte für schnelle und langsame Titrationen identisch waren).

Nach der Titration wurde die Lösung spektrophotometrisch untersucht. Sie besass ein Maximum bei 325 mμ (Fru-Gly) oder 340 mμ (Fru-Asp) und ein Minimum entsprechend bei 261 mμ und 269 mμ. Eine genauere Analyse des Einflusses der Wasserstoffionenkonzentration auf das Absorptionsspektrum hat bei Fructose-Glycin (Abb.32) und Fructose-Asparaginsäure (33) zu folgenden Ergebnissen geführt:

Abb.32

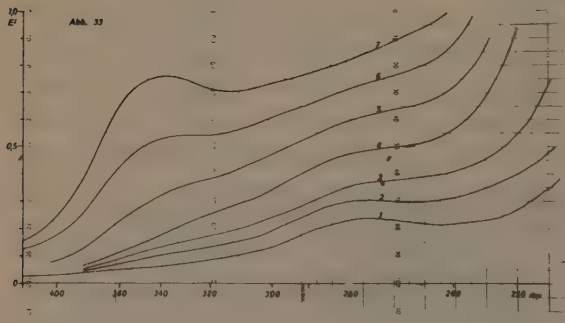


Das Absorptionsspektrum von Fructose-Glycin bei verschiedenen pH-Werten.

Ansatz:
$1{,}66.10^{-2}$m Fru-Gly in 0,1 m KCl,
Volumen = 12 ml

1. pH = 5,37 2. pH = 8,14 3. pH = 10,0 4. pH = 11,6
5. pH = 11,9 (0,4 ml 1 n KOH) 6. 0,5 ml 1 n KOH 7. 0,6 ml 1n

Abb. 33



Das Absorptionsspektrum von Fructose-Asparaginsäure bei verschiedenen pH-Werten.

Ansatz:
$1{,}66.10^{-2}$m Fru-Asp in 0,1 m KCl,
Volumen = 12 ml

1. pH = 2,80 2. pH = 4,55 3. pH = 8,15 4. pH = 10,02
5. pH = 12,15 6. pH = 12,45 7. pH = 12,70

Im Falle von Fructose-Glycin bildet sich im schwach alkalischen Bereich (nach Deprotonisierung der Ammoniumgruppe) eine flache

Schulter bei 277 mμ aus. Im stärker Alkalischen (ab pH = 11,9) entsteht bei 325 mμ ein Maximum, dessen Extinktion im Laufe der Messung stetig zunimmt, und ein Minimum bei 263 mμ, welches langsamer zunimmt.
Fructose-Asparaginsäure ergibt ein ähnliches Bild, nur dass schon bei pH = 2,80 ein deutliches Maximum bei 277 mμ und ein Minimum bei 261 mμ sichtbar wird. Im stärker Alkalischen erscheint das Maximum bei 340 mμ, anstatt 325 mμ wie bei Fructose-Glycin.

Wenn die Amadori-Verbindungen die Formel XIV oder XV hätten, dann wäre eine Absorption bei 325 mμ bzw. 340 mμ nicht zu erwarten. Formel XVI stellt jedoch nach von Euler und Eistert[86,S.242)] ein Monoamino-Redukton dar. Von den Reduktonen wiederum ist bekannt, dass sie je nach pH zwischen 260 mμ und 320 mμ absorbieren, z.B. das Trioseredukton: λ_{max} = 267 mμ bei pH = 6; λ_{max} = 314 mμ bei pH = 13,5. Das Trioseredukton-monoanil absorbiert bei 330 mμ (in Heptan).

Ad 2) Auch die Eigenschaft der Fructose-Asparaginsäure im schwach sauren Bereich eine Reduktionswirkung zu entfalten, weist auf eine Redukton-Natur hin[86)]. Anders als die Fructose-Asparaginsäure verhält sich das Fructose-Glycin: löst man es frisch (mit oder ohne Zusatz von Salzsäure), dann kann man es in Gegenwart von Kupfer(II)ionen bis pH = 11 und darüber titrieren, ohne dass eine Trübung der Lösung eintritt. Erst nach ca. 1-3 Stunden fällt (bei pH = 11) ein ziegelroter Niederschlag von Kupfer(I) oxyd aus. Benutzt man aber eine Lösung, die in 2.10^{-2} m HCl längere Zeit bei ca. + 2°C (und 25°C während der Titrationen) aufbewahrt wurde, dann stellt man fest, dass diese Lösung die Fähigkeit hat, genau so wie Fructose-Asparaginsäure bei pH = 6-7 Kupfer(II)ionen zu einwertigen Kupferionen zu reduzieren - ohne dass sich die pK-Werte der Substanz geändert hätten oder eine andere sichtbare Veränderung eingetreten wäre.

Die gemachten Beobachtungen zeigen, dass sich Amadori-Verbindungen in ihrem Reduktionsvermögen unterscheiden. Diese Unterschiede müssen sich im chemischen Formelbild ausdrücken lassen. Es wäre denkbar, dass die erst im alkalischen reduzierende Form die Halbacetalstruktur, die schon im sauren Bereich reduzierende dagegen die Enolstruktur und mit ihr im Gleichgewicht die Ketostruktur besitzt.

In Übereinstimmung damit haben Micheel und Heiskel[108] in neuester Zeit gefunden, dass es bei der polarographischen Reduktion von Amadori-Verbindungen zwei verschiedene Formen gibt: eine reduzierbare (Enaminolform?) und eine nicht reduzierbare (Halbacetalform?).

Auf Grund der diskutierten Ergebnisse könnte man den Metallchelaten mindestens drei verschiedene Formeln zuordnen, entsprechend der Halbacetal-, der Keto- oder der Enolform. Aus Kalottenmodellen (Stuart-Briegleb) geht hervor, dass Metallchelate dieser drei Formen möglich sind. Die stärksten Spannungen herrschen dabei in der Enaminolform, was jedoch diese Form nicht benachteiligen muss, weil die zur Ausbildung dieser Form benötigte Energie durch den Chelateffekt geliefert werden kann (dabei wurde angenommen, dass die Hydroxylgruppe am zweiten Kohlenstoffatom des Fructose-Anteils an der Chelatbildung beteiligt ist). Es wäre auch denkbar, dass Metallionen die Ausbildung der Enolform stark begünstigen. Ausserdem besteht die Möglichkeit einer Koordination der Hydroxylgruppe am dritten Kohlenstoffatom und bei oktaedrischen Komplexen am sechsten Kohlenstoffatom. In manchen Fällen (Ketoform) ist auch eine Koordination an C_4-OH und C_6-OH (an Kalottenmodellen) möglich.

Diese vielen Möglichkeiten zur Ausbildung einer Chelatstruktur sind wohl für die guten chelierenden Eigenschaften der Amadori-Verbindungen verantwortlich zu machen. Es wäre jedoch verfrüht, wenn man genaue Angaben über die Koordinationsstelle im Ligandmolekül machen wollte. Deshalb wurde bei der Diskussion der einzelnen Metallchelate die unbekannte Lage der koordinierten Hydroxylgruppe durch die Einführung des Restes „R" gekennzeichnet.

X. Über das Vorkommen von Amadori-Verbindungen in der Leber

Wie schon erwähnt wurde (S.14), haben Heyns und Paulsen[17] im Gegensatz zu Borsook und Mitarbeitern[4] in der Kalbsleber keine Fructose-Aminosäuren gefunden. Der Unterschied zwischen beiden Arbeitsgruppen bestand darin, dass Heyns und Paulsen die frische Leber 2 Minuten nach dem Schiessen des Tieres in flüssigem Stickstoff eingefroren, Borsook und seine Gruppe dagegen

nicht unter so extrem vorsichtigen Bedingungen gearbeitet haben. Die erwähnte Arbeit von Heyns und Paulsen beweist eindeutig, dass in der frischen Leber - also auch in der Leber des lebenden Tieres - keine Fructose-Aminosäuren vorhanden sind.

Was aber weder in der Heynsschen noch in der Borsookschen Arbeit deutlich ausgesprochen wird, ist, dass die Leber lebender Tiere Difructose-Aminosäuren enthält.

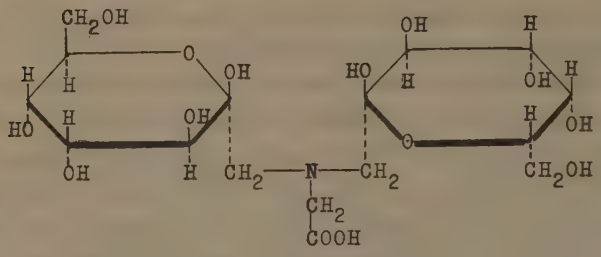
Um diese Behauptung zu beweisen, werden im folgenden Ergebnisse aus den Arbeiten von Heyns, Borsook und Anet gebracht:

(1) Heyns und Paulsen[17,S.160] stellten in ihrer Arbeit fest, dass „In der Leber eines Kalbes, die 2 Minuten nach dem Schiessen des Tieres in flüssigen Stickstoff eingefroren wurde, weder D-Fructose-Glycin noch andere Fructose-Aminosäuren nachgewiesen werden konnten. Nachweisbar war lediglich eine hinsichtlich ihrer Struktur noch nicht aufgeklärte Fraktion (S.167) ...Sie ist mit grösster Wahrscheinlichkeit identisch mit der Borsookschen Substanz 'band I'."

(2) In der Arbeit von Borsook[4] wird diese Substanz (band I) folgendermassen charakterisiert:
„All values are calculated on the basis of 2 hexoses and 1 amino acid residues per equivalent.
Total nitrogen: observed = 3,67 % calc. = 3,38-3,50 %
No. of titratable groups: acid = 1 basic = 1
Paper chromatography: butanol-acetic acid-water (4:1:1), R_f=0,04"
Nach Spaltung von 'band I' wurde papierchromatographisch Glycin und Alanin nachgewiesen.
Die erwähnte Substanz (band I) beschreibt Borsook folgendermassen (S.120): „An interpretation consistent with all of the analytical data is that band I is a mixture of two compounds, each of which consists of two hexoses and one amino acid, either alanine or glycine".
Die erwähnte Substanz erscheint bei einer Elution mit 0,2 n Trichloressigsäure von der Dowex X-50 Säule (H^+-Form) (vor Fructose-Glycin) als erste Fraktion (erste Bande).

(3) Im Jahre 1958 beschrieb Anet[24] eine neue Substanz: das Difructose-Glycin, welches er aus Natrium-Glycinat und überschüssiger D-Glucose (oder D-Mannose) durch 12 Minuten langes Erhitzen bei 100°C oder aus Na-Fructose-Glycinat und

D-Glucose (oder D-Mannose) durch 6 Minuten langes Erhitzen erhielt. Dieser Substanz schrieb Anet folgende Formel (XVII) zu, welche er durch Perjodatabbau und Isolierung einer Substanz von der Formel: $R.CO.CH_2.N(CH_2COOH)CH_2.CO.R$ bewies.



XVII

(Aus der angeführten Formel ist zu ersehen, dass der zweite Fructoserest nicht glycosidisch, wie das Borsook annahm, gebunden ist.)

Dieses Difructose-Glycin hat folgende Eigenschaften:

a) es erscheint bei der Säulenchromatographie an Dowex-50,X-4 als erste Fraktion, vor Fructose-Glycin (band I !),
b) der R_f-Wert in Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1) beträgt 0,48 des D-Fructose-Glycin-Wertes (Borsook gibt für das gleiche Lösungsmittel an: band I R_f = 0,04 und: D-Fru-Gly R_f=0,087. Daraus folgt: $R_{Fru-Gly}$ = 0,45 für 'band I').
c) Aus der Formel ist zu ersehen: 'band I' hat eine saure und eine basische Gruppe (pK_b = 5,4).

Aus den angeführten Daten geht eindeutig hervor, dass Anets Difructose-Glycin identisch ist mit 'band I' von Borsook und Heyns.
'band I' aber ist von Heyns und Borsook in der Leber nachgewiesen worden!

Es ergibt sich somit folgendes Bild:

a) In der Leber lebender Tiere sind Di-D-Fructose-Aminosäuren enthalten.
b) Diese Di-D-Fructose-Aminosäuren sind, wie Anet gezeigt hat, sehr labile Substanzen. Sie zerfallen binnen kurzer Zeit

in Monofructose-Aminosäuren und 3-Desoxyhexoson[27)29)]. Dieser Zerfall ist stark pH- und temperaturabhängig:

Zeit für den 2/3 Zerfall von Difructose-Glycin[25)]

Temperatur	pH = 3,5	pH 5,5	pH = 8
25°C	50 Tage	9 Tage	45 Tage
40°C	70 Std.	25 Std.	100 Std.
75°C	45 Min.	35 Min.	130 Min.
100°C	4 Min.	3 Min.	35 Min.

Im sauren Bereich zerfallen sie schneller als im alkalischen - Borsook und Heyns haben aber in Trichloressigsäure gearbeitet.

c) Bei der Aufarbeitung der Leber entstehen aus den Difructose-Aminosäuren Monofructose-Aminosäuren. Arbeitet man Leber nicht unter extrem vorsichtigen Bedingungen auf, dann muss man mehr Monofructose-Aminosäuren und weniger Difructose-Aminosäuren finden, was tatsächlich der Fall ist (s. Heyns[17)] S.167, und die Ergebnisse von Borsook[4)]).

d) Die Entstehung von Monofructose-Aminosäuren aus Difructose-Aminosäuren erklärt auch die Heynssche Beobachtung, nach der (S.160): „ihre Entstehung (d.h. von Fru-Gly und Fru-Ala) dürfte jedoch nicht auf eine chemische Synthese aus Glucose und den Aminosäuren zurückzuführen sein", denn sie entstehen, nicht wie Heyns angenommen hat aus einem metallstabilisierten N-Glycosid (Geyer[16)] hat gezeigt, dass Metallkomplexe von N-Glycosiden keine Amadori-Umlagerung erfahren!) oder durch die Wirkung von „entgleisten Fermenten"[17)S.167] - sondern aus Di-D-Fructose-Aminosäuren.

e) Es ist sehr unwahrscheinlich, dass Di-D-Fructose-Aminosäuren während der Aufarbeitung der Leber aus D-Glucose und Aminosäuren entstanden sind, da nach Anet[25)] die Ausbeute an Difructose-Glycin unter pH = 8 sehr gering oder gleich Null ist. Die Aufarbeitung erfolgte jedoch in beiden Fällen im sauren Milieu.

Abschliessend sei noch darauf hingewiesen, dass Di-D-Fructose-Aminosäuren auch zur Klasse der Amadori-Verbindungen gehören. In der Leber sind also Amadori-Verbindungen enthalten - aber nicht in Form der Mono- sondern in Form der Difructose-Aminosäuren.

Es fragt sich nun, was für eine Rolle diese Verbindungen in der Leber spielen könnten?

Erstens wäre an eine Rolle als starker, natürlicher Chelatbildner zu denken. Wie im vorangehenden Teil der Arbeit gezeigt wurde, sind Monofructose-Aminosäuren starke Chelatbildner für Cu, Ni, Zn-Ionen. Von den Difructose-Aminosäuren sollte man daher erwarten, dass sie noch stärkere Chelatbildner darstellen, da bei ihnen noch ein zusätzliches Koordinationszentrum (des zweiten Fructoserestes) hinzukommt und sie vierzähnig sein können. Auch liegt ihr pK_b-Wert niedriger, so dass ihre Chelatbildung mit Zink-, Nickel- und Kupferionen im physiologischen Bereich abgeschlossen sein sollte. Es ist zu erwarten, dass sie vorwiegend 1:1-Komplexe bilden werden. Diese Eigenschaften wären aber von grossem biochemischen Interesse, da die Difructose-Aminosäuren eine wichtige Rolle als natürliche Chelatbildner im Innern der Zelle spielen könnten.

Zweitens legt das weitverbreitete Vorkommen (s. S.15) den Gedanken nahe, dass diese Verbindungen auch für die Resorption von Metallionen durch die Darmschleimhaut von Bedeutung sein könnten.

Drittens sei an die reduzierende Wirkung von Amadori-Verbindungen gedacht, die,wie gezeigt wurde, im physiologischen pH-Bereich zweiwertiges zu einwertigem Kupfer reduzieren können. Sollte sich die Schubertsche Theorie der Strahlenschäden[3] als richtig erweisen, dann werden alle Substanzen interessant, die unter physiologischen Bedingungen Kupfer(II)ionen reduzieren können - und hierher gehören auch die Amadori-Verbindungen.

XI. Beschreibung der Versuche und Berechnungen

1. Die Darstellung reiner Liganden

a) D-Fructose-Glycin

1-Carboxymethylamino-1-desoxy-D-fructose

$C_8H_{15}NO_7$, M = 237,2

A. Nach der Vorschrift von Heyns und Paulsen[17].

10 g Glycin (Riedel de Haen, Erg.B 6) und 100 g wasserfreie D-Glucose (aus D-Glucose-monohydrat der Deutschen Maizena G.m.b.H. durch Trocknen über Phosphorpentoxyd im Vakuumtrockenschrank bei 65°C, ca. 3-5 Tage) wurden, fein verrieben, bei ca. 30°C 24 Std. über P_2O_5 getrocknet, dann in 2,5 l absolutem Methanol 3 Std. unterm Rückfluss gekocht, das Methanol im Rotationsverdampfer bei ca. 50°C verdampft (bis zur Sirupkonsistenz), dann in 200 ml Wasser gelöst und auf eine Lewatit-Säule S-100 (H^+-Form), 54 x 350 mm, aufgetragen, mit ca. 2,5 l H_2O gewaschen und dann mit 0,2 n Trichloressigsäure (TCE) eluiert. Die Fraktionen (ca. 20-25 ml) wurden papierchromatographisch auf Schleicher-Schüll 2043b, absteigend, in Butanol-Eisessig-Wasser (70:7:23) auf die Anwesenheit von Fructose-Glycin untersucht. Die Ninhydrin- und Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-positiven Fraktionen (Nr.154-275) aufgearbeitet. Zunächst wurde mit einem speziell für diesen Zweck konstruierten Perforator durch Ausäthern die Trichloressigsäure entfernt, wobei das pH der Lösung kontrolliert wurde. Nach Erreichen von pH = 3,5 wurde die wässrige Lösung bei 35°C im Rotationsverdampfer auf ca. 10 ml eingeengt und mit 10 ml Wasser, 20 ml absolutem Methanol und 150 ml Äther versetzt. Die gebildete Emulsion wurde abzentrifugiert und im Scheidetrichter getrennt. Die sirupöse Phase wurde im Vakuum bei 35°C 4 Std. getrocknet. Die glasige Masse (9,2 g) löste sich leicht in 10 ml Wasser bei 70°C. Danach erfolgte eine Entfärbung mit Carboraffin C (Produkt der Lurgi GmbH vertrieben durch die Farbenfabriken Bayer). Das Filtrat wurde mit 10 ml absolutem Methanol und

2,5 ml n-Butanol bei 70°C bis zur beginnenden Trübung versetzt. Nach einem Tag hatten sich gelblich-weisse Kristalle abgeschieden (6 g). Diese wurden aus 6 ml heissem (60°) Wasser + 6 ml abs. Methanol + 2,3 ml n-Butanol umkristallisiert.
Ausbeute: 5,3 g (nach Verwertung der Mutterlauge).
Nach nochmaliger Kristallisation (erfolgte in wenigen Minuten): weisse, gut erkennbare Kristalle. Ausbeute 4 g.
Papierchromatographisch enthielt die Substanz nur einen TTC- und ninhydrinpositiven Fleck.
Stickstoffanalyse (Kjeldahl): ber. N 5,92 %, gef. N 5,74 %.
Das IR-Spektrum, fest in KBr gepresst, gibt Abb.34 wieder. Es stimmt mit dem von Heyns und Paulsen angegebenen[17] überein.

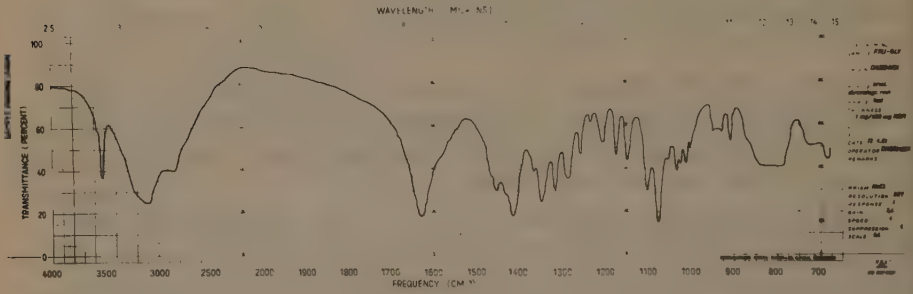


Abb.34. IR-Spektrum von Fructose-Glycin, fest in KBr

B. Verbesserte Methode (nach Reynolds[64])

360 g D-Glucose + 37,5 g Glycin + 42,5 g Natriummetabisulfit (wasserfrei, Merck) wurden in 50 ml Wasser bei 100°C (im Ölbad) eine Stunde gehalten. Der Sirup war dabei braun geworden. Danach wurde auf 1 l mit Wasser verdünnt, unter Rühren und äusserlicher Eiskühlung auf 25°C gekühlt, auf eine Lewatit S-100 Säule (H^+-Form, 54 x 400 mm) gebracht, mit 2 l Wasser gewaschen und mit 0,2 n Ammoniak eluiert. Die Fraktionen (15-25 ml) wurden wie bei A. papierchromatographisch untersucht, Nr.151-320 (ca. 2,5 l) im Rotationsverdampfer bei 40°C bis zur Sirupkonsistenz eingeengt (Farbe braun). Anschliessend wurde der Sirup bei 70°C in 80-proz. Methanol gelöst. Beim Erkalten fiel ein

leicht gelblich gefärbter, kristalliner Niederschlag aus.
Ausbeute: 23,5 g (+ 5 g eines nicht umkristallisierten, braun gefärbten Produkts).
Stickstoffanalyse (Kjeldahl): ber. N 5,92 %, gef. N 5,75 % .
Das IR-Spektrum stimmt mit dem nach Vorschrift A hergestelltem Präparat vollkommen überein.

b) D-Fructose-Asparaginsäure

1-N-(L-Asparaginsäure)-1-desoxy-D-fructose
$C_{10}H_{17}NO_9$, M = 295,3

10,3 g L-Asparaginsäure (Präparat von Dr. F.Schneider) in 200 ml H_2O gelöst und mit 1 n KOH auf pH = 5,95 gebracht (75 ml 1 n KOH), anschliessend über Calciumchlorid und Phosphorpentoxyd (Vakuum, 80°C, 3 Tage) getrocknet. Das trockene Präparat wurde in 2,7 l absolutem Methanol gelöst (fast vollständig) und mit 100 g wasserfreier D-Glucose 7 Stunden auf dem Ölbad mit Rückflusskühler gekocht. Dabei färbte sich die Lösung gelb. Danach wurde das Methanol im Rotationsverdampfer bei 40°C verdampft, der feste Rückstand in 400 ml warmem Wasser gelöst, auf eine Lewatit S-100 Säule (H^+-Form, 54 x 340 mm) gebracht, mit 2,5 l Wasser gewaschen und schliesslich mit 0,1 n Ammoniak eluiert. Die Fraktionen wurden wie bei Fructose-Glycin papierchromatographisch untersucht, ausserdem wurde die Rundfilterchromatographie eingesetzt, die ein schnelleres Arbeiten als die absteigende Chromatographie ermöglicht. Vorsichtshalber wurden die Fraktionen, die papierchromatographisch gleich waren, in zwei Teile getrennt und jeder Teil für sich aufgearbeitet.
Fraktion 240-360: bis zur Sirupkonsistenz eingeengt (ca. 8 ml), mit 8 ml Wasser + 40 ml abs. Methanol + 20 ml i-Propanol bei 60°C versetzt. Nach 2 Tagen war ein fein-kristalliner Niederschlag entstanden, der abgesaugt, mit abs. CH_3OH gewaschen und bei Zimmertemperatur im Vakuum (zuerst über $CaCl_2$ und dann über P_2O_5) getrocknet wurde. Ähnlich wurde nach dem Eindampfen die Mutterlauge aufgearbeitet.
Gesamtausbeute: 3,6 g.
Stickstoffanalyse (Dumas): das erste Kristallisat N = 4,55 %; das zweite Kristallisat (aus der Mutterlauge) N = 4,94 % .
Die Substanz war chromatographisch rein (s. wie bei Fru-Gly).

Das IR-Spektrum ist in Abb.35 wiedergegeben.

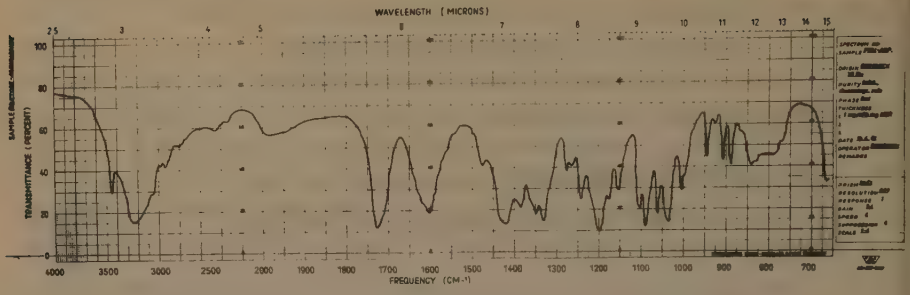


Abb.35. IR-Spektrum von Fructose-Asparaginsäure, fest in KBr

Fraktion 360-480: bis zur Sirupkonsistenz eingeengt, mit etwas Wasser verdünnt, mit Carboraffin C entfärbt und zum Filtrat (ca. 9 ml) 3 ml heissen i-Propanol gegeben. Es fiel ein öliger Sirup aus, der nach einigen Tagen bei Zimmertemperatur kristallin erstarrte. Abgesaugt, gewaschen (mit abs. Methanol) und getrocknet. Ausbeute: 1,5 g.
Stickstoffanalyse (Dumas): ber. N 4,74 %, gef. N 4,33 % .

c) D-Glucose-Glycin

2-Carboxymethylamino-2-desoxy-D-glucose
$C_8H_{15}NO_7 \cdot H_2O$ (Monohydrat) M = 255,2

Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift von Heyns und Breuer[33)36)]: 40 g feingepulvertes Glycin wurden mit einer Lösung von 400 g getrockneter D-Fructose (Merck, getrocknet bei 60°C über Phosphorpentoxyd im Vakuum) in 2,4 l abs. Methanol 3 Stunden zum Sieden erhitzt, vom Rückstand wurde abfiltriert (23 g nicht umgesetztes Glycin) und bei 40°C im Rotationsverdampfer auf Sirupkonsistenz (ca. 300 ml) eingeengt. Der Sirup wurde auf eine Lewatit S-100 Säule (H^+-Form, 54·750 mm) gebracht mit ca. 5 l Wasser und darauf mit 0,2 n Trichloressigsäure eluiert. Die Fraktionen (ca. 20 ml) wurden papierchromatographisch (Schleicher-Schüll 602 h:p-Papier, absteigend 3 Tage, Butanol-Eisessig-Wasser = 70:7:23) auf die Anwesenheit von Glucose-Glycin geprüft. Parallel dazu wurde die optische Drehung

gemessen, wobei es sich herausstellte, dass die Fraktionen, die reines Glucose-Glycin (oder dies vorwiegend) enthalten, eine positive Drehung aufweisen. Diese Fraktionen wurden weiter aufgearbeitet: die Trichloressigsäure wurde entfernt, die Lösung eingeengt, mit Aktivkohle behandelt und mit Methanol gefällt.
Ausbeute: 9 g.
Dieses Produkt wurde aus 40 ml Wasser + 40 ml abs. Methanol + 40 ml Äthanol (92 %) bei 60° umkristallisiert, gewaschen und über P_2O_5 im Vakuum bei Zimmertemperatur getrocknet.
Ausbeute: 5,5 g.
Stickstoffanalyse (Kjeldahl): ber. N 5,49%, gef. N 5,64 % .
Aus der potentiometrischen Titration (Abb.1 u. Abb.2) ist zu ersehen, dass der Laugeverbrauch auf ein Produkt mit einem Molekül Wasser deutet. Das Vorliegen eines Monohydrates wird auch durch das IR-Spektrum bestätigt, welches mit dem von Breuer[36] S.12 für das wasserhaltige Produkt angegebenen übereinstimmt (Abb.36).

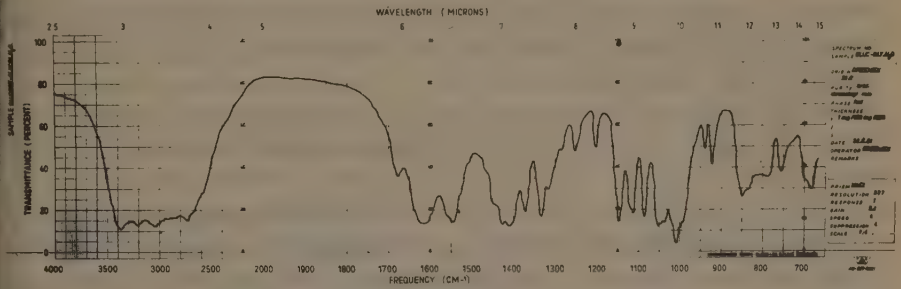


Abb.36. IR-Spektrum von Glucose-Glycin, fest in KBr

d) D-Glucosaminsäure

$C_6H_{13}NO_6$ (195,2) ber. N 7,17 %, gef. N 6,99 % .

Die Darstellung erfolgte nach Pringsheim und Ruschman[44].
Das Präparat wurde zweimal aus Wasser umkristallisiert.

2. Tierversuche

ad A (S.15). Weisse Mäuse, Gewicht ca. 30 g. Injektion intraperitoneal 3 mal je 100 mg Fru-Gly in 0,4 ml Ringerlösung. Glycininjektion: intraperitoneal, 120 mg in 0,6 ml Ringerlösung; 60 mg in 0,3 ml Ringerlösung.

ad B (S.16). Nüchterne weisse Mäuse, ca. 30 g, bekamen i.p. je 100 mg Fru-Gly[x]. Danach wurde der 24 Std.-Harn gesammelt. Die Maus befand sich während des Versuchs in einem Stoffwechselkäfig. Der Nachweis von Fru-Gly im Harn erfolgte mit Hilfe der Rundfilterchromatographie, wobei als Laufsystem das Gemisch Butanol-Eisessig-Wasser (70:7:23) und zum Sichtbarmachen Ninhydrin und Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) [bei 25°C!] benutzt wurden. Es gelingt besonders mit TTC auch sehr geringe Mengen an Fru-Gly nachzuweisen.

ad C (S.16). Der Reduktionstest wurde nach den Angaben von Borsook[4] durchgeführt, wobei die Reaktionsbedingungen etwas geändert wurden, da mit der Originalvorschrift keine geradlinige Abhängigkeit zwischen Extinktion und Konzentration an Fru-Gly erzielt werden konnte.
Vorschrift für den Reduktionstest: In Reagenzgläser (16 x 160 mm) werden je 1 ml 0,1 % $K_3Fe(CN)_6$-Lösung einpipettiert und in einem Thermostaten bei 20 ± 0,05 °C 10 Min. temperiert. Danach erfolgt die Zugabe von 0,1 ml der Fru-Gly enthaltenden Standard- oder Testlösung und von 0,2 ml 1 n NaOH. Nach 5 Minuten (exakt) wird 1 ml einer Eisen(III)sulfatlösung (in Phosphorsäure) und nach weiteren 5 Minuten 5 ml Wasser einpipettiert. Die Extinktion wurde in einem Eppendorf-Photometer bei 691 mμ gemessen. Die Ergebnisse der einzelnen Messreihen schwanken ziemlich stark, so dass jedesmal Standardwerte mitgemessen wurden.

ad D (S.16). Mäusen (wie oben) wurden i.p. Lösungen von Fru-Gly injiziert, wobei das Volumen maximal 0,8 ml betrug. Der aufgefangene Harn wurde direkt auf Fru-Gly untersucht; im Falle eines sehr grossen Volumens oder eines negativen Ergebnisses wurde der Harn auf ein möglichst kleines Volumen über Schwefelsäure im Vakuumexsikkator bei Zimmertemperatur eingeengt. Die kleinste

---

x) Präparat nach Methode B (S.75).

injizierte Fru-Gly-Menge betrug 0,1 mg pro Maus (in 0,2 ml Ringerlösung. In diesem Fall konnte jedoch kein sicherer Fru-Gly Nachweis erbracht werden.

ad E (S.16). Um zu vermeiden, dass im Harn nachgewiesenes Fru-Gly eventuell aus dem Kot der Ratten stammen könnte, wurde eine Punktion der freigelegten Harnblase vorgenommen. Die Injektionen führte Herr Dr. H.Pfeil im hiesigen Institut durch.

3. Warburg-Versuche

Die Methodik der Warburgversuche ist kürzlich von Weitzel und Buddecke[109] beschrieben worden. Deshalb wird im folgenden nur kurz über die Versuchsansätze berichtet, da sie nach dem Schema der erwähnten Arbeit von Frl. A.David im hiesigen Institut durchgeführt wurden.
Die Zellzahl variierte zwischen $30 \cdot 10^6$ und $35 \cdot 10^6$ Zellen pro Ansatz. Der Einsatz enthielt 1 ml der Asciteszellsuspension und 1 ml Krebs-Ringer-Puffer. In den Seitenarm wurde 0,1 ml der zu untersuchenden Lösung pipettiert. Die Temperatur betrug 37°C, die Versuchsdauer 90 Minuten, wobei die Ergebnisse zwischen der 30. und 90. Minute ausgewertet wurden. Die angegebenen Fehlergrenzen beziehen sich auf Parallelwerte der gleichen Zellsuspension.

4. Ausführung der Titrationen

Die Titrationen der freien Liganden als auch der metallhaltigen Lösungen wurden in einer Konzentration von 1.10^{-2}m - 2.10^{-2}m ausgeführt (ausser den Titrationen zur Ermittlung von log K'_{III}, die in 0,1 m Lösung stattfanden). Zur Aufrechterhaltung einer konstanten Ionenstärke wurde in einer 0,1 m Kaliumchloridlösung (hergestellt aus KCl, p.a. Merck) gearbeitet. Die Titrationen erfolgten in einem auf 25° ± 0,5°C termostatisierten Raum, in einem geschlossenen Gefäss, in welches eine Glaselektrode (Radiometer, Typ C für Titrationen bis pH = 11 und Typ B für Titrationen über pH = 11), eine gesättigte Kalomelelektrode, die Stickstoffzuleitung (alle Titrationen erfolgten unter reinstem Stickstoff, der in einer mit 50 % KOH beschickten Waschflasche gereinigt und in einer zweiten wassergesättigt wurde) und das Ende einer Glaskapillare eintauchten. Das Titrationsgefäss bestand aus

zwei Teilen, dem Boden und einem geschliffenen Deckel, in welchen Löcher für die Aufnahme der erwähnten Zuleitungen gebohrt waren. Zwischen jeder dieser Zuleitungen und dem entsprechenden Loch war ein sehr kleiner Zwischenraum (ca. 0,2-1,0 mm), durch den der eingeleitete Stickstoff entweichen konnte. In Vorversuchen wurde erprobt, dass selbst bei länger währenden Titrationen im stark alkalischen Bereich keine CO_2-Fehler auftraten. Die Titration erfolgte in den meisten Fällen mit 1 n KOH (im Falle der Titration einer 0,1 m Ligandlösung wurde mit 5 n KOH titriert), welche mit Hilfe einer Agla-Mikrometer-Glassyringe zugegeben wurde. Die Genauigkeit der Agla-Syringen beträgt 2.10^{-4} ml. Die 1 n KOH wurde unter Stickstoffatmosphäre aus „Merck" Titrisol-Ampullen hergestellt. Der untersuchte Ligand wurde in einer 1.10^{-2} - 2.10^{-2} m HCl-Lösung (aus „Merck" Titrisol-Ampullen) eingesetzt. Das Volumen der titrierten Lösung betrug am Anfang der Titration 10,00 ml. Die durch die KOH-Zugabe verursachte Volumenvergrösserung wurde bei den Berechnungen berücksichtigt. Das pH der Lösung wurde mit einem Radiometer pH 22 - Meter gemessen, die Genauigkeit beträgt 0,02-0,05 pH-Einheiten je nach Messbedingungen (Temperaturkonstanz, Netzschwankungen usw.). Die Lösung wurde mit einem Glaskörper/Magnetrührer turbiniert. Als Eichpuffer wurden NBS-Puffer verwendet[110].

5. Ermittlung der Basizitätskonstanten

Aus den Titrationskurven der freien Liganden („frei" bedeutet hier frei von Metallionen) wurden die Basizitätskonstanten ermittelt.

Die Basizitätskonstanten der Carboxylgruppen werden durch Berechnung des pH-Wertes gefunden, bei dem die Hälfte der Ligandmolekeln entprotonisiert ist, die andere Hälfte der Carboxylgruppen ihr Proton noch in undissoziierter Form enthält. Diese Tatsache folgt aus der Definition der Basizitätskonstante, die in Gl.1 wiedergegeben ist:

$$K' = \frac{[H_N R]}{[H^+] \cdot [H_{N-1} R]} \qquad (1)$$

Gl.1 stellt die Basizitätskonstante für eine N-Protonen enthaltende Säure dar.

Die Anzahl der Ligandmolekeln, die noch ihr Proton enthalten wird durch den Protonisierungsgrad $\bar{n}'$ angegeben, den man aus der Titrationskurve nach Gl.2 berechnen kann:

$$\bar{n}' = \frac{[H_N R] \cdot N + [\text{Anionen}] - [\text{Kationen}]}{[H_N R]} \qquad (2)$$

z.B. ist bei Fructose-Glycin + HCl die Anzahl der zur Verfügung stehenden Protonen (bis pH = 10) gleich zwei. Die Basizitätskonstante der Carboxylgruppe ist somit durch das pH gegeben (genauer gesagt der log-Wert der Basizitätskonstante) bei dem $\bar{n}' = 1,5$ ist.

Der log K-Wert der Aminogruppe lässt sich auch auf diese Weise bestimmen und zwar ist das der pH-Wert, bei dem $\bar{n}' = 0,5$ ist. Der so berechnete Wert fällt aber bei den untersuchten Liganden mit dem halben Äquivalent, der für die Neutralisation der Aminogruppe erforderlichen, Kalilauge zusammen. Er wurde deshalb direkt aus der Titrationskurve entnommen.

Bei der Berechnung des log K'_{III}-Wertes wurde die Tatsache berücksichtigt, dass sich die letzte Dissoziationsstufe von der Stufe der Aminogruppe deutlich unterscheidet. Man kann deshalb die vorhergehenden Dissoziationsstufen vernachlässigen und das negative Ligandmolekül (im Falle der Fructose-Asparaginsäure das zweifach negative Ligandmolekül) noch als einwertige Säure betrachten. Danach kann man den log K-Wert entweder aus dem pH-Wert, bei den $\bar{n}' = 0,5$ ist bestimmen, oder man kann auch auf die Albertschen Gleichungen zurückgreifen. (Diese Gleichungen werden später für die Berechnung der Stabilitätskonstante herangezogen.) In Analogie zur Stabilitätskonstante, die aus dem $\bar{n}$-Wert (s.S.83) berechnet wird, kann man die Stabilitätskonstante aus dem $\bar{n}'$-Wert berechnen. Die entsprechende Formel gibt Gl.3 wieder:

$$K_{III} = \frac{(1 - \bar{n}') \cdot [H^+]}{\bar{n}'} \qquad (3)$$

Die nach diesen Methoden berechneten log K'_{III}-Werte stimmen untereinander so gut überein (in den in Tab.2 wiedergegebenen Fehlergrenzen), dass diese Tatsache als Argument für die Abspaltung nur eines Protons pro Ligandmolekül im stark alkalischen Bereich angesehen wird (s.S.66).

Es sei noch erwähnt, dass die erste Carboxylgruppe der Fructose-Asparaginsäure bei so einem tiefen pH ihr Proton abspaltet, dass der log K_{Ia}-Wert (S.19) durch Extrapolation mit Hilfe von Gl.4 (die analog zur Gl.3 ist), berechnet wurde:

$$K_{Ia} = \frac{(3 - \bar{n}') \cdot [H^+]}{(\bar{n}' - 2)} \qquad (4)$$

6. Die spektrophotometrische Untersuchung

Die Absorptionsspektren der Liganden und Metallchelate wurden mit einem selbstregistrierenden Spektralphotometer der Firma Carl Zeiss, mit dem Gerät RPQ 20 A, ausgeführt.

Die zu untersuchenden Lösungen wurden in eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 2,500 cm einpipetiert (eventuell wurde die feste Substanz eingewogen), die Ionenstärke durch Zugabe von KCl-Lösung auf 0,1 m KCl gebracht und auf 12 ml mit Wasser aufgefüllt. Die KOH-Zugabe erfolgte (1 n KOH) mit einer Agla-Mikrometersyringe. Da das Volumen an zugegebener KOH relativ klein war, wurde in den Extinktionskurven keine Korrektur vorgenommen. Die registrierte Extinktion entspricht einem Lichtweg von 5,000 cm, da der Strahl zweimal durch die Küvette hindurchgeht. Das pH der Lösung wurde mit einer Glaselektrode gemessen (s.S.81). Die Lösung wurde mit einem flachen Glaskörper mit Hilfe eines Magnetrührers turbiniert.

7. Titration der Liganden in Gegenwart von Metallionen

Die Titrationskurven von metallhaltigen Lösungen wurden unter den angegebenen Bedingungen mit der oben beschriebenen Technik (s.S.80) aufgenommen. Die eingesetzten Metallsalze wurden als Lösungen hinzugesetzt, wobei ihre Konzentration entsprechend höher gewählt wurde. Es fanden folgende Metallsalze Verwendung:

Kupfer(II)chlorid: $CuCl_2 + 2H_2O$, M=170,52; Riedel de Haen, p.a.

Nickel(II)chlorid: $NiCl_2 + 6H_2O$, M=237,70; " "

Zink(II)sulfat: $ZnSO_4 + 7H_2O$, M=287,56; " "

In den Metallsalzlösungen wurde komplexometrisch der Gehalt an Metallionen durch Frl. Dr. A.M.Fretzdorff im hiesigen Institut bestimmt.

8. Berechnung der Stabilitätskonstanten der Metallchelate

Aus den Titrationskurven der Liganden in Gegenwart äquimolarer Mengen an Metallionen wurden die auf Seite 54 angegebenen Stabilitätskonstanten berechnet. Da nicht entschieden werden konnte, ob es sich um Alkoxo- oder Hydroxochelate handelt, wurde die Berechnung der Stabilitätskonstanten für beide Fälle durchgeführt.

Aus der Analogie zwischen den untersuchten Liganden und den in ihnen enthaltenen Aminosäuren wurde der log K_1-Wert in völliger Analogie zu den bei der Berechnung der Stabilitätskonstanten der Aminosäuren und Metallionen bekannten Verfahren berechnet. Es wurde in diesem Fall das von Albert angegebene Verfahren benutzt, welches relativ einfach und genau genug ist. Es sei deshalb auf die entsprechenden Arbeiten von Albert verwiesen[79a,b]

Die Berechnung der Stabilitätskonstante K_1 für Fructose-Glycin, Glucose-Glycin und Glucosaminsäure erfolgte nach den folgenden Gleichungen:

$$K_1 = \frac{\bar{n}}{(1-\bar{n})\cdot[LH^-]} \qquad (5)$$

$$[LH^-] = \frac{[L_t] + [HCl] - [KOH] - [H^+] + [OH^-]}{\beta} \qquad (6)$$

$$\beta = \frac{2[H^+]^2}{K_I \cdot K_{II}} + \frac{[H^+]}{K_{II}} \qquad (8)$$

$$K_I = \frac{[H^+]\cdot[LH_2]}{[LH_3^+]} \qquad (9)$$

$$K_{II} = \frac{[H^+]\cdot[LH^-]}{[LH_2]} \qquad (10)$$

$$\bar{n} = \frac{[L_t] - \alpha[LH^-]}{[M_t]} \qquad (11)$$

$$\alpha = \frac{[H^+]}{K_{II}} + \frac{[H^+]^2}{K_I \cdot K_{II}} + 1 \qquad (12)$$

Für Fructose-Asparaginsäure wurden α, β und $[LH^-]$ nach Gl. (12a), (8a) und (6a) berechnet.

$$\alpha = \frac{[H^+]}{K_{II}} + \frac{[H^+]^2}{K_{Ib} \cdot K_{II}} + \frac{[H^+]^3}{K_{Ia} \cdot K_{Ib} \cdot K_{II}} + 1 \qquad (12a)$$

$$\beta = \frac{[H^+]}{K_{II}} + \frac{2[H^+]^2}{K_{Ib} \cdot K_{II}} + \frac{3[H^+]^3}{K_{Ia} \cdot K_{Ib} \cdot K_{II}} \qquad (8a)$$

$$[LH^-] = \frac{2[L_t] + [HCl] - [KOH] + [OH^-]}{\beta} \qquad (6a)$$

Die einzelnen Symbole haben folgende Bedeutung:

K_1 - Stabilitätskonstante für den (1:1)-Komplex (s.S.52)

$\bar{n}$ - die Anzahl der durchschnittlich (scheinbar) pro Metallion gebundenen Ligandmoleküle beim entsprechenden pH-Wert

$[L_t]$ - die totale Ligandkonzentration (aus den jeder Titrationskurve beigefügten Daten zu entnehmen)

$[LH_3^+]$ - Konzentration an Ligandkationen (als Hydrochlorid)

$[LH_2]$ - " an Ligand in der Zwitterionenform

$[LH^-]$ - " " " mit entprotonisierter Ammoniumgruppe

$[HCl]$ - " " Salzsäure (in allen Fällen 10^{-2} m)

$[KOH]$ - " " zugegebener Kalilauge (kann aus den Titrationskurven direkt entnommen werden)[x]

$[H^+]$ - " " Protonen (kann aus dem jeweiligen pH-Wert der Titrationskurven berechnet werden

$[OH^-]$ - " " OH^--Ionen (kann bei pH-Werten kleiner als 10 vernachlässigt werden)

$[M_t]$ - die totale Metallkonzentration (kann aus den Daten der Titrationskurven entnommen werden)

K_I, K_{II} usw. die entsprechenden Dissoziationskonstanten (Tab.2)

---

x) bei allen Berechnungen wurde die durch die Zugabe von KOH verursachte Volumenveränderung berücksichtigt.

Die Berechnung der „over all" Konstante für den Fall des Alkoxokomplexes (s.S.51/52) erfolgte nach den folgenden Gleichungen, die unter gewissen vereinfachenden Annahmen abgeleitet wurden.

Für die Abgabe von Protonen durch das Metallchelat LMH nach Gl.(13):

$$LMH^+ \rightleftharpoons LM + H^+ \qquad (13)$$

kann man eine Dissoziationskonstante angeben (Gl.14):

$$K_2 = \frac{[LM]}{[LMH^+]} \qquad (14)$$

Um diese Dissoziationskonstante mit möglichst einfachen Rechenmethoden zu bestimmen, wurden folgende Überlegungen angestellt:

Die Bilanz aller (beweglichen) Wasserstoffatome gibt Gl.(15) wieder:

$$[H_t] = [H^+] + [LH^-] + 2[LH_2] + 3[LH_3^+] + [LMH^+] \qquad (15)$$

Da die Deprotonisierung des Metallchelates LMH^+ erst nach dessen Ausbildung stattfindet (wie aus den Titrationskurven zu ersehen ist), sind die Glieder LH^-, LH_2 und LH_3^+ der Gl.(15) in allen untersuchten Fällen so klein, dass sie vernachlässigt werden können:

$$[H_t] = [H^+] + [LMH^+] \qquad (15a)$$

Die Bilanz aller (beweglichen) Wasserstoffatome H_t kann aber auch durch die Gl. (16) ausgedrückt werden:

$$[H_t] = 2[L_t] + [HCl] - [KOH] \qquad (16)$$

Aus dieser Gleichung kann H_t berechnet werden, und aus Gl.(15a) kann man $[LMH^+]$ berechnen nach Gl. (15b):

$$[LMH^+] = [H_t] - [H^+] \qquad (15b)$$

Aus der Metallbilanz (Gl.17) kann man die Konzentration an [LM] berechnen, wenn man in diese Gleichung den Wert für $[LMH^+]$ aus der Gl. (15b) setzt:

$$[M_t] = [LM] + [LMH^+] + [M^{++}] \qquad (17)$$

da die Metallionenkonzentration $[M^{++}]$ nach der Ausbildung des Komplexes LMH^+ verschwindend klein ist: Gl.(18)

$$[LM] = [M_t] - [LMH^+] \qquad (18)$$

Die Gleichungen (15b) und (18) gestatten die Berechnung der Dissoziationskonstante K_2 (Gl.14), welche eine pH-abhängige Konstante darstellt. Das Produkt der Konstanten K_1 und K_2 (Gl.19) führt zu einem Ausdruck, der unter Hinzuziehung der Basizitätskonstante K'_{III} (Tab.2 S.19) und der Protonenkonzentration gemäss den Gleichungen (19), (20) und (21) zur Berechnung der pH-unabhängigen „overall" Konstante K des (1:1)-Chelates führt:

$$K_1 \cdot K_2 = \frac{[LMH^+]}{[LH^-] \cdot [H^+]} \cdot \frac{[LM]}{[LMH^+]} = \frac{[LM]}{[LH^-] \cdot [H^+]} \qquad (19)$$

$$[LH^-] = K'_{III} \cdot [L^{2-}] \cdot [H^+] \qquad (20)$$

$$K = K_1 \cdot K_2 \cdot K'_{III} \cdot [H^+] = \frac{[LM]}{[L^{2-}] \cdot [H^+]} \qquad (21)$$

Für die Berechnungen wurden fünf bis sechs Werte (entsprechend je 0,010 ml KOH) aus dem Mittelteil zwischen den einzelnen Stufen herangezogen.

Im Falle der Berechnung der Konstanten K_3 (und in manchen Fällen auch) und K_4, die für die Hydroxokomplexe gültig sind (nach Gl. (22)) wurde die Näherung gemacht, dass $[LMH(OH)] = [KOH]$ Verbrauch (nach dem dritten Äquivalent) ist. Die so gefundene Konstante variiert in ziemlich weiten Grenzen, deren Mittelwert den direkt aus der Titrationskurve entnommenen Wert (s.S.52,53) recht gut entspricht.

$$K_3 = \frac{[LMH(H_2O)^+]}{[LMH(OH)] \cdot [H^+]} \qquad (22)$$

Im Anhang wird ein Beispiel gegeben, welches die hier gemachten Ausführungen erläutert.

9. Ausführung der Versuche zur Bestimmung des Calciumbindungsvermögens

Der Bestimmung der Stabilitätskonstante der Calciumchelate liegt die Bestimmung der Konzentration an freien d.h. nicht an Ligand gebundenen Calciumionen zugrunde. Diese Bestimmung wurde durch Messung der Absorption einer Murexid, Calciumionen und

den Liganden enthaltenden Lösung bei zwei verschiedenen Wellenlängen (480 mμ und 520 mμ) durchgeführt.

Ausführung:
In eine Glasküvette mit einem Lichtweg von 10 mm wurden nacheinander folgende Lösungen pipettiert:

1 ml Ligandlösung (in Veronalpuffer) oder Veronalpuffer
+ 1 ml $1 \cdot 10^{-4}$ m Murexidlösung
+0,5 ml KCl-Veronalpuffer

Die Küvette wurde in ein Gestell gespannt und mit Hilfe eines Platindrahtes 60 Sek. gerührt (vorher hat man sich davon überzeugt, dass eine befriedigende Durchmischung der Lösung erreicht wurde). Danach wurde die Extinktion der Lösung in einem Zeiss-Spektrophotometer (Modell PMQII/M4QII) bei den Wellenlängen 480 mμ und 520 mμ gemessen. Nach der Messung wurde die Küvette wieder in das Gestell gespannt und in 10 Schritten wurden je 0,005 ml (von 0,005 ml bis 0,05 ml) einer 0,125 m Calciumchloridlösung aus einer Agla-Mikrometersyringe zugegeben. Nach jeder Calciumchloridzugabe wurde wieder 60 Sekunden gerührt und danach sofort die Extinktion gemessen. Ein ganzer Messvorgang dauert ca. 30 Minuten.

Aufstellen einer Eichkurve:
Nach der angegebenen Versuchsanordnung wurde eine Eichkurve aufgestellt. Der Ansatz enthielt:

1 ml 0,016 m Veronalpuffer pH = 7,20
+ 1 ml $1 \cdot 10^{-4}$ m Murexidlösung in aq.bidest
+ 0,5 ml KCl-Veronalpuffer pH = 7,20

Gemessen wurde die Extinktion bei 480 mμ und 520 mμ. Danach wurden steigende Mengen an 0,125 m Calciumchloridlösung zugesetzt und wieder die Extinktion gemessen. Aus den gemessenen Extinktionen wurde der Quotient φ gebildet:

$$\varphi = \frac{E_{480\ m\mu}}{E_{520\ m\mu}}$$

Die auf diese Weise ermittelte Eichkurve (Abhängigkeit von φ von der zugegebenen Calciumchloridmenge) gibt. Abb.37, Kurve 1 wieder.

Aus diesen Messungen wurde auch die scheinbare Stabilitätskonstante des Calciummurexids bestimmt. Der gefundene Wert von log K = 2,32 ± 0,02 (für pH = 7,20 ± 0,05 und Ionenstärke μ = 0,15 m KCl (s.S.61)) stimmt gut mit dem Ergebnis von Ettori und Scogan[98] (log K = 2,43, pH = 7,35 und μ = 0,15) überein.

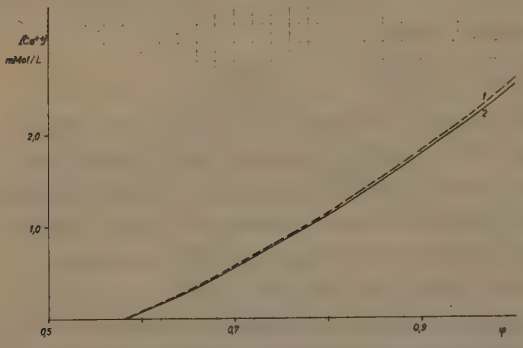


Abb.37

Eichkurve für die Bestimmung der freien Calciumionenkonzentration.

(Ansatz s.o. S.88)

1 = Die Abhängigkeit von φ von der $CaCl_2$-Konzentration
2 = Die Abhängigkeit der freien Ca^{++}-Konzentration von φ.

Die in Abb.37, Kurve 1 wiedergegebene Abhängigkeit gilt für das im Ansatz vorhandene totale Calcium. Für die Berechnung der Stabilitätskonstante ist aber die Konzentration an freiem (in diesem Fall: nicht an Murexid und Veronalpuffer gebundenem) Calcium von Interesse. Man erhält die Konzentration an freien Calciumionen, wenn man von der totalen Calciumkonzentration die an Murexid und Veronalpuffer gebundene Calciummenge subtrahiert. Diese Calciummenge kann aus den bekannten Konzentrationen und Stabilitätskonstanten von Murexid und Veronal berechnet werden (die Stabilitätskonstante für das Veronal-Calcium wurde nach Schubert und Lindenbaum[100] mit K = 4,3 angenommen). Abb.37, Kurve 2 gibt die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse für die freien Calciumionen wieder.

Messung in Gegenwart des Liganden:
Nach der angegebenen Versuchsanordnung wurde die Extinktion einer Murexid, Calciumionen und Ligand enthaltenden Lösung gemessen. Je grösser das Calciumbindungsvermögen, desto kleiner der Quotient φ, desto kleiner auch die nach Abb.37, Kurve 2

bestimmte Konzentration an freiem Calcium. Aus der auf diese Weise bestimmten Calciumionenkonzentration wurde die Stabilitätskonstante berechnet (s.S.60).

10. Für die Bestimmung des Calciumbindungsvermögens benutzte Substanzen

a) Reagenzien

Murexid: Murexid der Fa. Merck/Darmstadt (Indicatoren für die Massanalyse) wurde zweimal umkristallisiert: 2 g Murexid wurden in 500 ml bidest. Wasser[x)] bei 50°C 5 Minuten gerührt. Vom Ungelösten wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde mit gesättigter Ammoniumchloridlösung (NH_4Cl, p.a. Merck) versetzt und über Nacht in den Eisschrank gestellt. Die ausgeschiedenen Kristalle wurden abzentrifugiert, in ca. 350 ml bidest. Wasser gelöst und mit heiss gesättigter Ammoniumchloridlösung versetzt. Nach der Kristallisation im Eisschrank wurde abzentrifugiert, mit Wasser nachgewaschen und im Vakuumexikkator über H_2SO_4 getrocknet. Herstellen einer 1.10^{-4}m Lösung: 56,84 mg des wasserfreien Murexids wurden in 100 ml H_2O bidest. gelöst und 5 ml dieser Lösung auf 100 ml verdünnt. Die Lösung wurde täglich frisch bereitet. Nach dem Auflösen wurde sofort gemessen.

Veronalpuffer $1{,}66.10^{-2}$m: 23,0 ml einer 0,1 n Veronalnatriumlösung und 18,50 ml einer 0,1 n HCl (Titrisol, Merck) wurden auf 250 ml aufgefüllt, das pH wurde gemessen und wenn nötig korrigiert.

KCl + Veronalpuffer: Aus Kaliumchlorid (p.a. Merck) wurde in $1{,}66.10^{-2}$m Veronalpuffer eine 0,75 m Lösung bereitet, deren pH nachgeprüft und korrigiert wurde.

b) Ligandlösungen

Alle Liganden wurden in $1{,}66.10^{-2}$m Veronalpuffer, pH = 7,20, gelöst.

Citronensäure (p.a. Merck), Monohydrat. Die Citronensäurelösung wurde mit 1 n KOH auf pH = 7,20 gestellt. Der Gehalt an Citronensäure wurde durch potentiometrische Titration ermittelt.

---

x) Für alle Messungen wurde durch einen Ionenaustauscher entionisiertes und aus einer Quarzdestille dest. Wasser benutzt.

Gluconsäure. Gluconsäurelacton (Merck) wurde mit 1 KOH bei pH = 7,20 mit Hilfe eines automatischen Titrators (Radiometer, Kopenhagen) über Nacht in Gluconsäure übergeführt.

Glucuronsäure. D(+)-Glucorun (Hoffmann la Roche, Basel) unterm Titrator über Nacht mit 1 n KOH auf pH = 9,0 gehalten, dann mit 1 n HCl auf pH = 7,20 eingestellt.

Galacturonsäure. D-Galacturonsäure-monohydrat (Fluka A.G./Buchs) mit 1 n KOH auf pH = 7,20 gebracht.

Fructose-Glycin (nach Verfahren B, S.75) und Glucose-Glycin wurden mit 1 n KOH auf pH = 7,20 gestellt.

Die polymeren Substanzen wurden von Herrn Dr. E.Buddecke zur Verfügung gestellt. Sie wurden als Kaliumsalze eingesetzt.

Heparin (Hoffmann la Roche/Basel) wurde chromatographisch durch Dr. E.Buddecke[116] gereinigt. Durch Titration wurde ein Gehalt von 2,4 Sulfatgruppen pro Disaccharideinheit (DSE) festgestellt. Das „DSE-Gew." wurde zu 659 angenommen.

Chondroitinsulfat-A (aus dem kristallisierten Ba-Salz von M.Schubert, New York); „DSE-Gew." = 535.

Chondroitinsulfat-B (Dr. Winterstein, Basel); „DSE-Gew." = 535.

Rindernasenknorpel: Chondroitinsulfat-Portein aus Rindernasenknorpel. Darstellung nach Gerber et al.[111]: Fraktion PP-L enthält Chondroitinsulfat-A mit 20 % Protein; „DSE-Gew." = 642.

Hyaluronsäure: von Dr. Gibian, Berlin; „DSE-Gew." = 417.

Polystyrolsulfat (Dr. M.Schubert, New York) „Mol-Gew." = 444 (entsprechend zwei Monomeren).

Dextransulfat (Präparat der BIOS.-Lab. New York) auf Grund eines ermittelten S-Gehaltes von 2,05 % wurde ein „Mol-Gew." von 1550 angenommen (ca. 10 Glucoseeinheiten pro Sulfatgruppen).

11. Berechnung der Stabilitätskonstanten der Calciumchelate

Die Berechnung des Calciumbindungsvermögens erfolgte nach den auf S.60 angegebenen Formeln. Im Anhang wird ein Beispiel gebracht. Die Stabilität wurde als „Physiologische Bindungskonstante" berechnet.

12. Zusammenhang zwischen „Physiologischer Bindungskonstante" und „Over-all" Stabilitätskonstante

Die „Physiologische Bindungskonstante" wurde durch Weitzel et al.[99] eingeführt. Ihre ausführliche Begründung findet man bei Engelmann[112]. Für die in dieser Arbeit berechneten physiologischen Bindungskonstanten der (1:1)-Calciumkomplexe ergibt sich folgender Zusammenhang zwischen der physiologischen Bindungskonstante und der pH-unabhängigen „Over-all" Stabilitätskonstante.

Definitionen:
Für die Reaktion zwischen einem Metallion M und einem Liganden L (Gl.23):

$$M + L \rightleftharpoons ML \qquad (23)$$

wird die Stabilitätskonstante definiert durch:

$$K_1 = \frac{[ML]}{[M]\cdot[L]} \qquad (24)$$

wobei [L] die Konzentration an freiem (d.h. nicht an Metall gebundenem) und entprotonisiertem Liganden (d.h. in der mit dem Metallion ohne Protonenabgabe reagierenden Form) bedeutet. Die so definierte over-all-Konstante ist somit pH-unabhängig.

Die physiologische Bindungskonstante wird für die Reaktion (Gl.25):

$$M + LH_N \rightleftharpoons ML + N\cdot H^+ \qquad (25)$$

gegeben durch:

$$b_1 = \frac{[ML]}{[M]\cdot\gamma} \qquad (26)$$

wobei γ die Konzentration an freiem Liganden ohne Rücksicht auf den Protonisierungsgrad bedeutet und durch Gl.(27) definiert ist:

$$\gamma = \sum_{k=0}^{n} [LH_k] \qquad (27)$$

Im Falle eines Liganden LH (n=1) ist somit:

$$\gamma = [LH] + [L] \qquad (27a)$$

und

$$b_1 = \frac{[ML]}{[M]\cdot([L] + [LH])} \qquad (26a)$$

Der durch Weitzel[99] gegebene Zusammenhang:

$$K = B \cdot \alpha \tag{28}$$

wobei

$$\alpha = 1 + \frac{[H^+]}{K_d} \tag{29}$$

erlaubt eine Berechnung der pH-unabhängigen Stabilitätskonstante K, wenn die Dissoziationskonstante K_d für die Reaktion:

$$LH \rightleftharpoons L^- + H^+ \tag{30}$$

$$K_d = \frac{[L] \cdot [H^+]}{[LH]} \tag{31}$$

bekannt ist.

Dieser Zusammenhang ist ohne weiteres aus den folgenden Gleichungen ersichtlich:
aus Gl. (31) folgt:

$$\frac{[H^+]}{K_d} = \frac{[LH]}{[L]} \tag{31a}$$

und

$$1 + \frac{[H^+]}{K_d} = 1 + \frac{[LH]}{[L]} \tag{32}$$

aus Gl.(28) wird α gleich:

$$\alpha = 1 + \frac{[H^+]}{K_d} = 1 + \frac{[LH]}{[L]} = \frac{[L]+[LH]}{[L]} \tag{33}$$

setzt man in Gl.(26a) diesen Wert für α ein, dann kommt man zu K:

$$B_1 \cdot \alpha = \frac{[ML]}{[M] \cdot ([L] + [LH])} \cdot \frac{[L]+[LH]}{[L]} = \frac{[ML]}{[M] \cdot [L]} = K_1$$

13. Stickstoffanalysen

Der Stickstoffgehalt wurde entweder nach der Methode von Dumas in der Modifikation von Gysel[117] oder nach der Methode von Kjeldahl in der Modifikation von Beet[113] durch Herrn Huber und Frl. Dahlström bestimmt.

14. Metallanalysen

Der Gehalt an Metallionen wurde von Frl. Dr. A.M.Fretzdorff nach „Merck"[114] und Schwarzenbach[115] durch Titration mit Äthylendiamintetraacetat (ÄDTA) komplexometrisch bestimmt.

15. Papierchromatographie[118]

Papier: Schleicher u. Schüll 2043b und 602 h:p.
Lösungsmittel: n-Butanol/Eisessig/Wasser = 70:7:23 [17]
Ninhydrinreagens: 0,2 % Ninhydrin in wassergesättigtem n-Butanol
TTC-Reagens: Triphenyltetrazoliumchlorid in wässriger oder methanolischer Lösung (4 %) wurden mit der gleichen Menge 2 n Natronlauge (wässriger oder methanolischer) vor Gebrauch gemischt.

Zusammenfassung

1. 1-Carboxymethylamino-1-desoxy-D-fructose (Fructose-Glycin), 1-N-(L-Asparaginsäure)-1-desoxy-D-fructose (Fructose-Asparaginsäure), 2-Carboxymethylamino-2-desoxy-D-glucose (Glucose-Glycin) und D-Glucosaminsäure wurden kristallin und chromatographisch rein dargestellt und ihr Metallbindungsvermögen gegenüber Kupfer(II)-, Zink(II)- und Nickel(II)ionen untersucht.

2. In einer äquimolaren Lösung bilden Fructose-Glycin, Fructose-Asparaginsäure, Glucose-Glycin und Glucosaminsäure mit Nickel(II)ionen bis pH=11 stabile, in Wasser lösliche (1:1)-Chelate; mit Zink(II)ionen bilden nur Fructose-Glycin und Fructose-Asparaginsäure stabile und lösliche (1:1)-Chelate, dagegen zerfallen die (1:1)-Chelate von Glucose-Glycin und Glucosaminsäure unter Zinkhydroxydbildung. Kupfer(II)ionen werden von Fructose-Asparaginsäure, Fructose-Glycin und Glucose-Glycin unterschiedlich leicht zu Kupfer(I)oxyd reduziert; Lösungen von Glucosaminsäure scheiden im schwach sauren Bereich Kupfer(II)hydroxyd aus.

3. Im Falle eines (2:1)-Ligand:Metall-verhältnisses bilden außer den Fructose-Glycin-, Fructose-Asparaginsäure- und Glucose-Glycin-Kupferkomplexen (die reduziert werden) und Glucosaminsäure-Zinkkomplexen (aus denen Zinkhydroxyd ausfällt) die übrigen Liganden und Metallionen stabile und lösliche (1:1)- bzw. (2:1)-Komplexe.

4. An Hand der titrimetrischen und spektrophotometrischen Daten wird die Möglichkeit zur Ausbildung von Alkoxochelaten diskutiert, welche die Alkalistabilität der erwähnten Metallkomplexe erklären.

5. Die freien Liganden Fructose-Glycin, Fructose-Asparaginsäure und Glucose-Glycin spalten bei pH > 11 Protonen ab, deren Basizitätskonstante bestimmt wurde. Aus dieser Tatsache und der Fähigkeit Kupfer(II)ionen entweder im schwach Sauren oder erst im Alkalischen zu reduzieren, wird auf das Vorliegen von zwei verschiedenen tautomeren Formen in wässriger Lösung geschlossen.

Es werden eine (im alkalischen Bereich reduzierende) Pyranosidstruktur und eine (schon im schwach Sauren reduzierende) Reduktonstruktur (Enolform) vorgeschlagen.

6. Mit Hilfe der potentiometrischen Titration wurden die Stabilitätskonstanten der (1:1)-Chelate berechnet. Die für die Alkoxochelate berechneten Werte liegen weit über den bei Aminosäure-Metallkomplexen angetroffenen Stabilitätskonstanten und befinden sich in der Größenordnung der Iminodiessigsäure-Metallkomplexe oder darüber. Auch die Stabilitätskonstanten der Hydroxokomplexe werden angegeben.

7. Gestützt auf die Versuche von Heyns[17], Borsook[4] und Anet[24)25)27] wird die Hypothese aufgestellt, dass in der Leber Difructose-Aminosäuren vorkommen.

8. Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, daß Amadori-Verbindungen als starke Chelatbildner eine Rolle im biologischen Geschehen spielen können.

9. Das Calciumbindungsvermögen von Fructose-Glycin, Glucose-Glycin, Hydroxysäuren, Mucopolysacchariden und deren Bausteinen wurde unter physiologischen Bedingungen untersucht. Die Stabilitätskonstanten dieser Calciumkomplexe werden erstmalig angegeben. Ein besonders hohes Calciumbindungsvermögen besitzt das Heparin. Die Stabilitätskonstanten der Chondroitinsulfat-Calciumkomplexe können die Calciumbindung im Bindegewebe erklären.

1o. In Tierversuchen wurde gezeigt, daß Fructose-Glycin langsam oder gar nicht im Säugetierkörper metabolisiert wird, an Asciteszellen, dass Fructose-Glycin nicht glykolisiert wird. Es hemmt sehr schwach die anaerobe Gärung von Glucose und ruft keinen Crabtree-Effekt hervor.

A N H A N G

Beispiel 1: Berechnung der Stabilitätskonstante des Fructose-Glycin-Nickel (1:1)-Komplexes. Die benutzten Zahlenwerte stammen von der in Abb.19, Kurve 2 wiedergegebenen Titration.

Ansatz: 1.10^{-2}m Fru-Gly + $0,9624.10^{-2}$m $NiCl_2$ + 10^{-2}m HCl + 0,1 m KCl

V = 10,00 ml (Volumen am Anfang der Titration)

V ml 1n KOH	pH	β	[LH] Mol/L	α	$\bar{n}$	K_1
0,130	4,98	$1,2881.10^{3}$	$0,9871.10^{-2}$	$1,2891.10^{3}$	0,3124	$0,8483.10^{5}$
0,130	5,21	$0,7586.10^{3}$	$0,7786.10^{-2}$	$0,7596.10^{3}$	0,4156	$0,9130.10^{5}$
0,150	5,44	$0,4467.10^{3}$	$1,1018.10^{-2}$	$0,4477.10^{3}$	0,5188	$0,9784.10^{5}$
0,160	5,65	$0,2755.10^{3}$	$1,4279.10^{-2}$	$0,2765.10^{3}$	0,6222	$1,1533.10^{5}$
0,170	5,90	$0,1549.10^{3}$	$1,9031.10^{-2}$	$0,1549.10^{3}$	0,7254	$1,3880.10^{5}$

Mittelwert $1,0562.10^{5}$

$\log K_1 = 5,01 \pm 0,10$

V ml ln KOH	pH	[LMH] Mol/L	[LM] Mol/L	K_2	$K_1 \cdot K_2$	$K'_{III} \cdot [H^+]$	K
0,230	7,50	$0,6843.10^{-2}$	$0,2564.10^{-2}$	0,3746	$0,3956.10^{5}$	$0,8910.10^{5}$	$0,3525.10^{1}$
0,240	7,68	$0,5858.10^{-2}$	$0,3540.10^{-2}$	0,6043	$0,6383.10^{5}$	$0,5887.10^{5}$	$0,3758.10^{1}$
0,256	7,85	$0,4878.10^{-2}$	$0,4511.10^{-2}$	0,9247	$0,9767.10^{5}$	$0,3982.10^{5}$	$0,3889.10^{1}$
0,260	8,02	$0,3897.10^{-2}$	$0,5483.10^{-2}$	1,4069	$1,4860.10^{5}$	$0,2691.10^{5}$	$0,3999.10^{1}$
0,270	8,21	$0,2921.10^{-2}$	$0,6450.10^{-2}$	2,2081	$2,3322.10^{5}$	$0,1737.10^{5}$	$0,4051.10^{1}$

Mittelwert: $0,3844.10^{1}$

$\log K = 9,58 \pm 0,03$

Die in diesen Berechnungen benutzten Symbole sind auf den Seiten 84-87 erläutert.

Beispiel 2: Berechnung der Stabilitätskonstante des Calciumgluconatkomplexes.

Ansatz: 1 ml 0,2 m Gluconsäure in 0,0166 m Veronalpuffer, pH=7,2
+ 1 ml 1.10^{-4}m Murexidlösung in H_2O bidest.
+ 0,5 ml 0,75 m KCl in 0,0166 m Veronalpuffer, pH=7,2
Mit einer Agla-Mikrometersyringe wurden 10 Portionen zu je 0,005 ml 0,125 m $CaCl_2$-Lösung dazugegeben.

V ml $CaCl_2$	$[Ca_t]$ Mol/L	Gluconsäure Mol/L	E_{520}	E_{480}	φ	$[Ca^{++}]$ Mol/L	$K_{CaGluc.}$
0,0	-	0,0800	0,528	0,304	0,576	-	-
0,015	$0,740.10^{-3}$	0,0795	0,512	0,336	0,656	$0,345.10^{-3}$	14,5
0,020	$0,984.10^{-3}$	0,0794	0,507	0,344	0,679	$0,465.10^{-3}$	14,1
0,025	$1,229.10^{-3}$	0,0792	0,501	0,354	0,707	$0,610.10^{-3}$	12,9
0,030	$1,470.10^{-3}$	0,0790	0,496	0,361	0,728	$0,715.10^{-3}$	13,5
0,035	$1,712.10^{-3}$	0,0789	0,491	0,368	0,749	$0,820.10^{-3}$	13,9
0,040	$1,953.10^{-3}$	0,0787	0,487	0,375	0,770	$0,932.10^{-3}$	14,2
0,045	$2,193.10^{-3}$	0,0786	0,483	0,383	0,793	$1,045.10^{-3}$	14,2
0,050	$2,431.10^{-3}$	0,0784	0,478	0,389	0,814	$1,160.10^{-3}$	14,2

Mittelwert: $14,0 \pm 1,1$

$\log K_{Calciumgluconat} = 1,15 \pm 0,04$

Die in diesen Berechnungen benutzten Symbole sind auf S.60 erläutert.

Literaturverzeichnis

1) Ch.Ingold, R.S.Nyholm und M.L.Tobe, Nature 187,477 (1960)
2) P.Collmann et al., Chem.Eng.News 3.IV.1961, S.46
3) J.Schubert, Chem.Eng.News 3.IV.1961, S.25.
4) H.Borsook,A.Abrams und P.H.Lowy, Journ.Biol.Chem. 215, 111 (1955)
5) H.H.Baer „Chemie der Aminozucker", Fortschr.chem.Forsch. 3, 822 (1958)
6) R.Kuhn „Aminozucker", Angew.Chem. 69, 23 (1957)
7) A.B.Foster und D.Harton „Aspects of the Chemistry of the Aminosugars", Adv.Carbohydrate Chem. 14, 213 (1959)
8) J.E.Hodge, „The Amadori Rearrangement", Adv.Carbohydr. Chem. 10, 169 (1955)
9) R.Kuhn und F.Weygand, Ber.dtsch.chem.Ges. 70, 769 (1937)
10) A.Gottschalk, Nature 167, 845 (1951)
11) A.Gottschalk, Biochem.J. 52, 455 (1952)
12) A.Abrams, P.H.Lowy und H.Borsook, Journ.Amer.Chem.Soc. 77, 4794 (1955)
13) P.H.Lowy und H.Borsook, Journ.Amer.Chem.Soc. 78,3175 (1956)
14) E.F.L.J.Anet, Austral.J.Chem. 10, 193 (1957)
15) J.Duborg und P.Devillers, Bull.Soc.Chim.France 333 (1957)
16) H.U.Geyer, Dissertation Giessen, (1959)
17) K.Heyns und H.Paulsen, Liebigs Ann.Chem. 622, 160 (1959)
18) K.Heyns und W.Schulz, Chem.Ber. 93, 128 (1960)
19) J.Enseime und A.Chapot, Bull.soc.chim.biol. 42, 279 (1960)
20) K.Onodera, T.Uehara und S.Kitaoka, Bull.Agr.Chem.Soc. 24, 703 (1960)
21) E.L.Richards, Biochem.J. 64, 639 (1956)
22) G.P.Ellis, „The Maillard-Reaktion", Adv.Carbohydr. Chem. 14, 63 (1959)
23) E.F.L.J.Anet und T.M.Reynolds, Austral.J.Chem. 10,182 (1957)
24) E.F.L.J.Anet, Chem.and Ind. 1438 (1958)
25) " Austral.J.Chem. 12, 280 (1959)
26) " Austral.J.Chem. 12, 491 (1959)
27) " Journ.Am.Chem.Soc. 82, 1502 (1960)
28) " Chem. and Ind. 345 (1960)
29) " Austral.J.Chem. 13, 396 (1960)

30) K.Heyns, R.Eichstedt und K.H.Meinecke, Chem.Ber. 88,1551(1955)
31) K.Heyns und W.Stumme, Chem.Ber. 89, 2833 (1956)
31a) " " Chem.Ber. 89, 2844 (1956)
32) J.F.Carson Journ.Am.Chem.Soc. 77, 1881 (1955)
32a) " Journ.Am.Chem.Soc. 77, 5957 (1955)
32b) " Journ.Am.Chem.Soc. 78, 3728 (1956)
33) K.Heyns und H.Breuer, Chem.Ber. 91, 2750 (1957)
34) K.Heyns, H.Paulsen und H.Breuer, Angew.Chem. 68, 334 (1956)
35) K.Heyns, H.Breuer und H.Paulsen, Chem.Ber. 90, 1374 (1957)
36) H.Breuer, Dissertation Hamburg, (1958)
37) K.Heyns und M.Rolle, Chem.Ber. 92, 2439 (1959)
38) " " Chem.Ber. 92, 2451 (1959)
39) R.Kuhn und W.Biester, Liebigs Ann.Chem. 602, 217 (1957)
40) L.F.Leloir und C.E.Cardini, Biochim.Biophys.Acta 12,15 (1953)
40a) " " Biochim.Biophys.Acta 20,33 (1956)
41) S.Ghosh, H.J.Blumenthal, E.Davidson und S.Roseman, Journ.Biol. Chem.235, 1265 (1960)
42) P.Karrer und J.Mayer, Helv.Chim.Acta 20, 407 (1937)
43) W.Schaeg, Dissertation Giessen, (1957)
44) H.Pringsheim und G.Ruschman, Ber.dtsch.chem.Ges. 48,680 (1915)
45) P.A.Levene, Biochem.Z. 124, 37 (1921)
46) P.A.Levenne und C.C.Christman, Journ.Biol.Chem. 120,575 (1937)
47) M.Ebata, Sci.Rept.Kanazawa Uni. 4, 41 (1955) nach C.A. 52,15433
48) K.Heyns und H.Paulsen, Angew.Chem. 69, 600 (1957)
49) S.Roseman, „Metabolism of connective tissue", Ann.Rev. Biochem. 28, 545 (1959) [bes. S.563, s.S.7]
50) Y.Imanaga, J.Biochem. (Tokio) 44, 819 (1957)
51) " J.Biochem. (Tokio) 45, 647 (1958)
52) J.M.Merrick und S.Roseman, Journ.Biol.Chem. 235, 1274 (1960)
53) M.Imaizumi, J.Biochem. (Tokio) 26, 197 (1937)
54) E.Buddecke, „Biochemie des Bindegewebes", Angew.Chem. 72 663 (1960)
55) H.Gibian, „Mucopolysaccharide und Mucopolysaccharidasen", F.Deuticke Verl., Wien (1959)
56) „Chemie und Stoffwechsel von Binde- und Knochengewebe) (7. Mosbacher Colloquium), Springer-Verl., Berlin, Göttingen, Heidelberg (1956)
57. P.W.Kent und M.W.Whitehouse „Biochemistry of Aminosugars", Butterworth Scietific Publications, London (1955)

58) E.Buddecke, Z.physiol.Chem. 318, 33 (1960)

59) A.Heidland, K.Klütsch und H.Hochrein, Klin.Wschr. 39,51(1961)

60) J.R.Dunstone, Biochem.J. 72, 465 (1959)

61) J.G.F.Gilbert und N.A.Myers, Biochim.Biophys.Acta 42,469(1960)

62) M.B.Mathews, Biochim.Biophys.Acta 37, 285 (1960)

63) J,Bjerrum, G.Schwarzenbach und L.G.Sillén, „Stability Constants of Metallion Complexes with Solubility Products of Inorganic Substances. Part I: Organic Ligands", The Chemical Society, London, Special Publication No.6 (1957)

64) T.M.Reynolds, Austral.J.Chem. 12, 266 (1959)

65) F.Lingens, H.Hellmann und M.Hildinger, Ztschr.Naturforschung 13b, 727 (1958)

66) F.Lingens, M.Hildinger und H.Hellmann, Biochim.Biophys.Acta 30, 668 (1958)

67) F.Lingens und S.Kern, Z.physiol.Chem. 318, 56 (1960)

68) C.H.Doy und F.Gibson, Biochem.J. 72, 586 (1959)

69) C.H.Doy, Nature 189, 461 (1961)

70) F.Gibson, C.H.Doy und S.B.Segall, Nature 181, 549 (1958)

71) F.Gibson und C.Yanofsky, Biochim.Biophys.Acta 43, 489 (1960)

72) F.Weygand, Angew.Chem. 71, 746 (1959)

73) D.L.Ingles und T.M.Reynolds, Austral.J.Chem. 11, 575 (1958)

74) P.Nordin und J.A.Johnson, Cereal Chem. 34, 170 (1957)

75) H.Kisaki, Chem.Abstr. 53, 22581 (1959)

76) P.Nordin und Y.S.Kim, J.Agr.Food Chem. 6, 765 (1958)

77) H.G.Crabtree, Biochem.J. 23, 536 (1929)

78) I.M.Klotz, I.L.Faller und J.M.Urquhart, J.Phys.Colloid.Chem. 54, 18 (1950)

79) A.Albert, Biochem.J. 47, 531 (1950)

79a) " Biochem.J. 50, 690 (1952)

79b) " Biochem.J. 54, 646 (1953)

80) M.Quintin, J.Chim.phys. 47, 898 (1950)

81) S.Chaberek und A.E.Martell, „Organic Sequestering Agents", J.Wiley and Sons Inc. (1959) [bes. S.72, 308

82) S.Chaberek Jr., R.C.Courtney und A.E.Martell. Journ.Am.Chem. Soc. 75, 2185 (1953)

83) G.Schwarzenbach, Anal.Chem. 32, 6 (1960)

84) S.Chaberek Jr. und A.E.Martell, Journ.Am.Chem.Soc. 74, 6062 (1952)

85) B.Kirson und J.Barsily, Bull.Soc.chim.France, 901 (1959)

6) H.v.Euler und B.Eistert, „Chemie und Biochemie der Reduktone und Reduktonate", F.Enke, Stuttgart (1957)

7) H.L.Schläfer und O.Kling, Angew.Chem. 68, 667 (1956)

8) S.Chaberek Jr. und A.E.Martell, Journ.Am.Chem.Soc. 74, 5052 (1952)

9) R.Leberman und B.R.Rabin, Nature 183, 746 (1959)

10) S.Pelletier, J.Chim.phys. 57, 287 (1960)

11) N.C.Li, B.E.Doody und J.M.White, Journ.Am.Chem.Soc. 80, 5901 (1958)

12) A.E.Martell, S.Chaberek Jr., R.C.Courtney, S.Westerback und H.Hyytiainen, Journ.Am.Chem.Soc. 79, 3036 (1957)

13) R.C.Warner und J.Weber, Journ.Am.Chem.Soc. 75, 5086 (1953)

14) R.L.Pecsok und R.S.Juvet Jr., Journ.Am.Chem.Soc. 77,202(1955)

15) G.Schwarzenbach und H.Gysling, Helv.Chim.Acta 32,1314 (1949)

16) J.Raaflaub, „Metal Buffers and Metal Indicators", Meth.Biochem.Anal. 3, 301 (1956) Interscience Publ. N.Y., London

17) J.Raaflaub, Z.physiol.Chem. 288, 228 (1951)

18) J.Ettori und S.M.Scogan, Arch.Biochem.Biophys. 76,213(1958)

19) G.Weitzel, J.Engelmann und A-M.Fretzdorff, Z.physiol.Chem. 315, 236 (1959)

20) J.Schubert und A.Lindenbaum, Journ.Am.Chem.Soc. 74, 3529 (1952)

21) G.N.Reilley, (Messungen von R.S.Juvet), Analyt.Chem. 32, 2 (1960)

22) R.K.Cannan und A.Kibrick, Journ.An.Chem.Soc. 60,2314 (1938)

23) T.R.Hughes und I.M.Klotz, „Analysis of Metal-Protein Complexes", Meth.Biochem.Anal. 3, 365 (1956), Interscience Publ. N.Y. London

24) E.Buddecke und R.Drzeniek, Z.physiol.Chem. (Manuskript eingeschickt)

25) D.D.Perrin, Journ.Am.Chem.Soc. 82, 5642 (1960)

26) F.Weygand, Ber.dtsch.chem.Ges. 70, 769 (1938)

27) " Ber.dtsch.chem.Ges. 75,1259 (1940)

28) F.Micheel und E.Heiskel, Chem.Ber. 94, 143 (1961)

29) G.Weitzel und E.Buddecke, Z.physiol.Chem. 323, 14 (1961)

30) R.G.Bates, „Electrometric pH-Determinations", J.Wiley u. Sons, New York (1954)

31) B.R.Gerber, E.C.Franklin und M.Schubert, Journ.Biol.Chem. 235, 2870 (1960)

32) J.Engelmann, Diplomarbeit Giessen (1956)

33) A.E.Beet, Nature 175, 514 (1955)

114) Merck,A.G., (Darmstadt): Komplexometrische Bestimmungsmethoden mit Titriplex.

115) G.Schwarzenbach, „Die komplexometrische Titration", Die chemische Analyse Bd.45, F.Enke, Stuttgart (1957)

116) E.Buddecke, Z.physiol.Chem. 320, 33 (1960)

117) H.Gysel, Helv.chim.Acta 35, 802 (1952)

118) J.M.Hais und K.Macek, „Handbuch der Papierchromatographie" Bd.I, VEB G.Fischer, Jena (1958)

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

Anorganische Chemie:	W.Jakób, K.Brodersen
Organische Chemie:	W.Troszkiewicz, H.Kuczynski, E.Plazek, H.Hellmann, Eugen Müller
Physikalische Chemie:	Śmialowski, Sokalski, Gumiński
Physiologische Chemie und Biochemie:	T.Baranowski, W.Mejbaum-Katzenellenbogen, G.Weitzel, G.Schramm, H.Friedrich-Freksa, G.Hillmann, A.Gierer
Physik:	H.Gostkowski, Wesolowski, G.Möllenstedt,
Mathematik:	Mochnacki
Kristallographie und Mineralogie:	Kamiński
Allgemeine und chemische Maschinenkunde:	J.Krakowski
Elektrotechnik:	Lubelski
Chemisches Ingenieurwesen:	T.Hobler, Z.Ziółkowski
Anorganische Technologie:	T.Blasiak
Organische Technologie:	Cz.Mazonski
Technologie des Erdöls und der flüssigen Brennstoffe:	Z.Tomasik
Katalyse:	Z.Sokalski
Physiologie:	K.Brecht, Bartels
Zoophysiologie:	F.P.Möhres, Huber
Anatomie:	K.Mörike, E.Tonutti

L e b e n s l a u f

Am 5.Dezember 1929 wurde ich als Sohn des Schuhmachermeisters Viktor D r z e n i e k und seiner Ehefrau Luzie geb. Piontek in Radlin Kr.Rybnik/Oberschlesien geboren. Von 1936 bis 1941 besuchte ich die Volksschule in Radlin. Danach von 1941 bis 1945 die Oberschule in Rybnik und von 1946 bis 1948 die Oberschule in Kreuzburg/Oberschlesien, von 1948 bis 1950 die Oberschule in Weichsel/Oberschlesien. Im Jahre 1950 begann ich das Studium der Chemie an der Technischen Hochschule Gleiwitz, welches ich 1954 mit der Prüfung I. Grades („Ingenieur-Prüfung") beendete. Das Studium II.Grades begann ich 1954 in Breslau, wo ich im Jahre 1957 (nach Anfertigung einer Diplomarbeit) die „Magister-Ingenieur"-Prüfung bestand. Schon während des Studiums II.Grades nahm ich eine Stelle als Wissenschaftlicher Assistent im Physiologisch-Chemischen Institut der Medizinischen Akademie Breslau bei Professor Dr. T.Baranowski im Jahre 1955 an. Im Jahre 1957 wechselte ich in die Biochemische Abteilung des Instituts für Immunologie und Experimentelle Therapie der Polnischen Akademie der Wissenschaften in Breslau (Leiter Professor Dr. T.Baranowski) über, wo ich bis 1958 die Stelle eines Älteren Assistenten inne hatte. Seit September 1958 wohne ich in der Bundesrepublik. Im November 1958 wurde mir durch das Kultusministerium des Landes Baden-Württemberg mein Studium anerkannt und die Erlaubnis zum Führen des Titels Dipl.-chem. erteilt. Im Physiologisch-chemischen Institut der Eberhard-Karls-Universität bin ich seit Oktober 1958 . Nach der Anerkennung der Diplom-Prüfung habe ich mit meiner Doktorarbeit begonnen. Im Oktober 1959 habe ich geheiratet.